

MARCO ANTÔNIO DE LORENZO

**ESTUDO DO EFEITO DO TIPO ANSIOLÍTICO DA
Cuphea carthagenensis (JACQ.) J.F. MACBR.
(SETE-SANGRIAS) EM CAMUNDONGOS**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
curso de Pós-graduação em Farmacologia
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Farmacologia.**

**Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina
Monteiro de Lima Nogueira**

**Florianópolis – SC
2000**

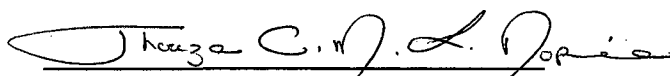
**“ ESTUDO DO EFEITO DO TIPO ANSIOLÍTICO DA *Cuphea
Cartagenensis* (JACQ.) J. F. MACBR (SETE-SANGRIAS) EM
CAMUNDONGOS**

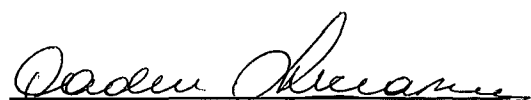
POR

MARCO ANTÔNIO DE LORENZO


**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Banca Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:**

Banca Examinadora:


**Thereza C.M. de Lima Nogueira
(FMC/UFSC-Membro-Titular)**


**Caden Soucar
(EPM/UNIFESP -Membro Titular)**


**Moacir Serraiyo Faria
(CFS-CCB/UFSC-Membro Titular)**


**Prof. Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC**

Florianópolis, 11 de Abril de 2000.

LORENZO, Marco Antônio de. **Estudo da atividade do tipo ansiolítica da *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. em camundongos.** Florianópolis, 2000, XX pp. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Profa. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira

Defesa: 11/04/2000

Esse estudo avaliou a atividade do tipo ansiolítica do extrato aquoso (EA) e de uma fração semi-purificada (PPT-3) da *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr., popularmente conhecida como sete-sangrias. Para este fim foi utilizado o modelo experimental do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos. Nossos resultados mostram que o EA (0,25 – 1,0 g/kg v.o.) e o PPT-3 (0,1 – 0,5) alteram significativamente tanto os parâmetros espaço-temporais quanto etológicos nesse modelo, o que indica um efeito do tipo ansiolítico, promovendo um aumento da frequência e permanência dos animais nos braços abertos, bem como o número de imersões de cabeça e uma redução do número de estiramentos.

Os mesmos tratamentos, no entanto, não apresentaram nenhum efeito em testes complementares, realizados com o intuito de se obter algum indicativo do mecanismo de ação ansiolítico observado. Os testes realizados foram o sono induzido por barbitúrico, e convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) ou por eletrochoque transcorneal máximo, onde drogas que atuam como os benzodiazepínicos são facilmente detectáveis. Esses resultados complementares associados ao fato de que o pré-tratamento com antagonistas de receptores colinoceptivos nicotínicos neuronais, mecamilamina e metilcaconitina, foram capazes de reverter o efeito do tipo ansiolítico exercido pelo EA, sugerindo que este efeito possa envolver, direta ou indiretamente esses receptores. No entanto, o mecanismo molecular de ação responsável por esse efeito do tipo ansiolítico da *Cuphea carthagenensis*, assim como sua toxicologia, necessita ser melhor investigado.

Palavras-chave: ansiedade, planta medicinal, validação, sete-sangrias, labirinto em cruz elevado.

"Não sou nada.

Nunca serei nada.

Não posso querer ser nada

À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo."

(Fernando Pessoa, *Tabacaria* - 15/01/1928)

À Dalva

e Marcus (*in memoriam*),

meus pais, que me deram a vida,

o bem precioso de que me servi

e me sirvo - fonte inesgotável de

possibilidades.

AGRADECIMENTOS:

À minha orientadora, Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima Nogueira, por ter me permitido estar nos últimos 2 anos aprendendo num ambiente de amizade, confiança e incentivo.

A todos os professores da Coordenadoria Especial de Farmacologia da UFSC, pela qualidade do curso e, em especial, àqueles com quem tive mais contato.

À direção e funcionários do Biotério Central e aos funcionários do Biotério Setorial de Coordenadoria Especial de Farmacologia, especialmente o Pedro, o Neto e o Rodrigo, pelo constante apoio.

Aos amigos da "turma de 98": George, Janice, Luciana, Rodrigo, Marcelo, Sandra, Eunice, Juliano e Márcia.

A todos os que passaram pelo laboratório da professora Thereza, com os quais convivi por algum período de tempo e que deixaram ali uma parte de si, compondo assim a história daquela pequena sala de grandes ideais: Néia, Sandro, Rafa, Elaine, Filipe, Raquelzinha, Viviani, Patrícia, Raquel, Ricardo e Fábio (amigão desde os tempos da Rural).

Aos professores do Setor de Produtos Naturais da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP, Dr. Antonio J. Lapa, Dra. Caden Souccar, Dra. M. Teresa R. Lima-Landman e Rosely O. Godinho pela oportunidade de, direta ou indiretamente, aprender com eles.

Aos amigos e funcionários do SPN-EPM Tânia, Lusiele, Salete, André, Ana Claudia, Elaine e a todo o pessoal do FARMATOX-BR.

Ao amigo e admirável professor Xico (Elson) da Rural, meu ídolo no campo das ciências, pela orientação e amizade.

Aos demais professores do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, Luis, *Mestre Sidarta* (Marinho), *Mestre Lucas* e Fred, pela minha formação e por sua amizade.

Às minhas irmãs Dadá (Glaucia) e Claudinha pelo amor, amizade e apoio em todas as fases da minha vida.

Ao meu querido sobrinho Matheus, menino-mágico, capaz de trazer com seu sorriso alegria aos meus dias mais difíceis.

Ao Marco Aurélio, meu cunhado, pelo apoio e incentivo, particularmente na minha chegada a esta terra nova.

Ao pessoal lá de casa (PIG'S) Free (Pedro), Bob (Bruno) e Luizão (Luizão mesmo), pelo convívio harmonioso e solidário de irmãos que se apoiam na luta do dia-a-dia.

Ao Cangaia: Caudo Seizo (Cláudio Sérgio), Lampião (Paulo), Flô (Cristiano), Ferrerinha (Guilherme), Sô Zabumba (Carlão), pelos momentos de alegria, esperança e expressão criativa que me mantiveram longe do cansaço e da tristeza. E às Cangaletes: Sara, Sabrina, Martha, Marcia, Carol, Mari e Érica pelo cuidado e encanto feminino com que impulsionam o grupo.

À Andréia (Flôr), pela doce companhia e pelos momentos legais que vivenciamos juntos.

Aos velhos e bons Riba, Jhonva, Chang, Cássio, Geovane e Diana, pela grande amizade.

À música: alimento, medicamento, alento, elemento essencial de que sou constituído, da qual não posso me separar.

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

A vocês, pequenos animais, frágeis *irmãos* que jamais lerão estas linhas e que aos milhões têm "doador" suas vidas à eterna busca do conhecimento dos meios de conservar as nossas.

LISTA DE ABREVIACÕES

5HT – 5-hidroxitriptamina (serotonina)
5HT_{1A} – Receptor serotoninérgico tipo 1A
8-OHDPAT – 8-hidroxi-dipropil-aminotetralina
A – Número de entradas nos braços abertos
A+F – Número de entradas totais nos braços abertos e fechados
Ach – Acetilcolina
APA – Associação de Psiquiatria Americana
BDZ – Benzodiazepínico
CA – Campo Aberto
CCB – Centro de Ciências Biológicas
CPQBA – Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrônomicas
CRF – Fator de liberação de corticotrofina
DSM-III – Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais – 3ª edição
DSM-III-R – Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais – 3ª edição revisada
DSM-IV – Manual de Diagnóstico e Estatística das Doenças Mentais – 4ª edição
DZP – Diazepam
EA – Extrato aquoso
ECM – Eletrochoque máximo transcorneal
EPM – Escola Paulista de Medicina
F – Número de entradas nos braços fechados
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GABA_A – receptor GABAérgico do tipo A
i.c.v. – intracerebroventricular
i.p. – intraperitoneal
INFAR – Instituto Nacional de Farmacologia “José Ribeiro do Valle”
LCE – Labirinto em cruz elevado
MA – Mecamilamina
MCP – Matéria cinzenta periaquedutal
MLA – Metilcaconitina
p.o. – *per os*
PBS – solução fosfato tamponada
PPT-3 – Precipitado obtido pela terceira centrifugação do EA no processo de fracionamento
PTZ – Pentilanotetrazol
RCM – Receptor colinoceptivo muscarínico
RCN – Receptor colinoceptivo nicotínico
RCNn – Receptor colinoceptivo nicotínico neuronal
RR – Rota rod
SNC – Sistema nervoso central
SNP – Sistema nervoso periférico
SPN – Setor de Produtos Naturais
TA – Tempo de permanência nos braços abertos
TAE – Transtorno agudo de estresse
TAG ou **GAD** – Transtorno de ansiedade generalizado ou *generalized anxiety disorder*
TEPT – Transtorno de estresse pós-traumático
TOC – Transtorno obsessivo compulsivo
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo
v.o. – via oral

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	i
LISTA DE ABREVIACÕES	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO	1
Plantas medicinais	1
<i>Cuphea carthagenensis</i>	8
Ansiedade	12
Tratamento	18
OBJETIVO	20
MATERIAL E MÉTODO	21
Material Botânico	21
Preparo do Extrato Aquoso (EA)	21
Fracionamento do EA	22
Animais	22
Drogas e soluções	23
Administração das drogas	24
Procedimentos gerais	25
Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	25
Convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol (PTZ)	27
Convulsões por eletrochoque transcorneal máximo (ECM)	27
Sono induzido por barbitúrico	27
Campo Aberto	28
Rota-rod (RR)	28
Análise estatística	29
RESULTADOS	30
Efeito do tratamento agudo com diazepam (DZP)	30
Efeito do tratamento agudo com o EA de <i>C. carthagenensis</i>	34
Efeito da administração repetida de EA da <i>C. carthagenensis</i>	38

Influência da mecamilamina no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA da <i>C. carthagenensis</i>	44
Efeito da mecamilamina na atividade locomotora e na performance motora nos testes de campo aberto e rota-rod	48
Avaliação do efeito da mecamilamina no labirinto em cruz elevado	51
Influência da metilcaconitina no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA da <i>C. carthagenensis</i>	54
Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT-3 da <i>C. carthagenensis</i>	58
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE ESQUEMAS, FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Esquema 1 – Estudos farmacodinâmicos e toxicológicos para um novo medicamento	6
Esquema 2 – Razões para validar as plantas medicinais	7
Figura 1 – <i>Cuphea carthagenensis</i>	10
Figura 2 – <i>Cuphea carthagenensis</i> em detalhe	11
Tabela 1 – Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o DSM-IV	15

RESULTADOS

Figura 1 – Efeito do diazepam (0,5 ; 1,0 e 2,5 mg/kg i.p.) para os parâmetros porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE	31
Figura 2 - Efeito do diazepam (0,5 ; 1,0 e 2,5 mg/kg i.p.) para os parâmetros entradas nos braços fechados, entradas totais e imersões de cabeça no LCE	32
Tabela 1 - Efeito do diazepam (0,5 ; 1,0 e 2,5 mg/kg i.p.) nos demais parâmetros obsevados no LCE	33
Figura 3 - Efeito da administração aguda do EA (0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg v.o.) para os parâmetros porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE	35
Figura 4 - Efeito da administração aguda do EA (0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg v.o.) para os parâmetros entradas nos braços fechados, entradas totais e imersões de cabeça no LCE	36
Tabela 2 - Efeito da administração aguda do EA (0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg v.o.) nos demais parâmetros obsevados no LCE	37
Figura 5 - Efeito da administração repetida do EA (0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg v.o.) para os parâmetros porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE	40
Figura 6 - Efeito da administração aguda do EA (0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg v.o.) para os parâmetros entradas nos braços fechados, entradas totais e imersões de cabeça no LCE	41

Tabela 3A - Efeito da administração repetida do EA (0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg v.o.) nos demais parâmetros observados no LCE	42
Tabela 3B - Efeito da administração repetida do EA (0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg v.o.) no teste de convulsões por PTZ	43
Figura 7 - Influência da mecamilamina (15µmol/kg i.p.) no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA agudo de <i>C. carthagenensis</i> , para os parâmetros porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE	45
Figura 8 - Influência da mecamilamina (15 µmol/kg i.p.) no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA agudo de <i>C. carthagenensis</i> , para os parâmetros entradas nos braços fechados, entradas totais, imersões de cabeça e estiramentos no LCE	46
Tabela 4 - Influência da mecamilamina (15 µmol/kg i.p.) no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA agudo de <i>C. carthagenensis</i> , nos demais parâmetros observados no LCE	47
Figura 9 - Efeito da mecamilamina (15µmol/kg i.p.) no teste do campo aberto, para os parâmetros quadros explorados, levantamentos, auto-limpeza e defecação	49
Figura 10 - Efeito da mecamilamina (15µmol/kg i.p.) no teste do rota-rod, para os parâmetros tempo de permanência e número de quedas	50
Figura 11 – Influência da mecamilamina (15µmol/kg i.p.) nos parâmetros porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE	52
Figura 12 - Influência da mecamilamina (15µmol/kg i.p.) nos parâmetros entradas nos braços fechados, entradas totais, imersões de cabeça e estiramentos no LCE	53
Figura 13 - Influência da meticaconitina (30 nM/2µL i.c.v.) no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA agudo de <i>C. carthagenensis</i> , para os parâmetros porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE	55
Figura 14 - Influência da meticaconitina (30 nM/2µL i.c.v.) no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA agudo de <i>C. carthagenensis</i> , para os parâmetros entradas nos braços fechados, imersões de cabeça e estiramentos no LCE	56

Tabela 5 - Influência da meticacconitina (30 nM/2μL i.c.v.) no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA agudo de <i>C. carthagenensis</i> , nos demais parâmetros observados no LCE	57
Figura 15 - Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT—3 da <i>C. carthagenensis</i> , para os parâmetros porcentagem de entradas e de tempo nos braços abertos do LCE	60
Figura 16 - Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT-3 da <i>C. carthagenensis</i> , para os parâmetros entradas nos braços fechados, entradas totais e imersões de cabeça no LCE	61
Tabela 6 - Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT-3 da <i>C. carthagenensis</i> , para os demais parâmetros observados no LCE	62
Tabela 7 - Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT-3 da <i>C. carthagenensis</i> , no teste do sono induzido por barbitúrico	63
Tabela 8 - Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT-3 da <i>C. carthagenensis</i> , no teste de convulsões por eletrochoque máximo	64
Tabela 9 - Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT-3 da <i>C. carthagenensis</i> , no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol	65

RESUMO

RESUMO

A *Cuphea carthagenensis*, conhecida popularmente como sete-sangrias, é utilizada em forma de chá como anti-hipertensiva, diurética, diaforética, anti-sifilítica, contra as afecções de pele e mucosa, etc.

Estudos anteriores realizados no nosso laboratório mostraram que o extrato aquoso (EA) desta planta, em tratamento intragástrico oral agudo (1h) ou repetido (14 dias *bid*) produziu um efeito do tipo ansiolítico no modelo do labirinto em cruz elevado (LCE) em camundongos, sem, no entanto, produzir prejuízos na atividade locomotora ou na performance motora e promover depressão do sistema nervoso central desses animais (De Lima, 1998; Gavioli, 1998).

O presente estudo investigou a atividade do tipo ansiolítica do EA e do PPT-3 da *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. no modelo do LCE. Na tentativa de se obter maiores informações sobre este efeito foram utilizados testes complementares e antagonistas nicotínicos neuronais como pré-tratamento.

Camundongos machos foram tratados com o EA da planta (0.25, 0.5 e 1.0 v.o.) agudo e repetido e, em ambos os tratamentos o EA apresentou um efeito do tipo ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado. O tratamento repetido com o EA não promoveu tolerância nos animais para o efeito ansiolítico e, tampouco, foi eficaz em modelos padrões para estudo de atividades de compostos do tipo benzodiazepínico, como sono barbitúrico e convulsões induzidas por pentilenotetrazol ou por eletrochoque transcorneal máximo.

Outros estudos realizados com o EA e com uma fração semi-purificada (PPT-3) desta planta mostraram que, em preparações de diafragma de camundongo o EA e o PPT-3 potenciaram as contrações musculares, sugerindo uma ação de seus constituintes na transmissão neuromuscular. Observou-se também uma reversão do bloqueio da transmissão neuromuscular produzido pela d-tubocurarina e succinilcolina e um retardamento do bloqueio neuromuscular produzido pela α -bungarotoxina, indicando a interação destes compostos com o receptor colinérgico nicotínico (Viel, 1998). No presente estudo, o tratamento com antagonistas de receptores nicotínicos neuronais, mecamilamina e metilcaconitina, reverteu o efeito ansiolítico do EA avaliado no LCE.

O tratamento agudo com o PPT-3 (0,1; 0,25; 0,5 g/kg, v.o.) produziu o efeito ansiolítico apenas na dose de 0,25 g/kg e em nenhuma das doses usadas alterou os parâmetros do testes complementares. Ao contrário do que ocorreu em preparações isoladas, o processo de purificação não concentrou os princípios ativos responsáveis pelo efeito do tipo ansiolítico.

De uma maneira geral, os resultados obtidos neste trabalho indicam que o EA de *Cuphea carthagenensis*, e a fração semi-purificada PPT-3 apresenta na sua constituição princípios biologicamente ativos com atividade do tipo ansiolítica. Esse efeito envolve, direta ou indiretamente, os receptores nicotínicos neuronais e seu mecanismo de ação molecular deve ser objeto de investigação de estudos futuros.

ABSTRACT

ABSTRACT

Cuphea carthagenensis, popularly known in Brazil as “sete-sangrias”, has its infusion used in folk medicine as antihypertensive, diuretic, diaphoretic, in skin diseases, etc.

Preliminary studies (De Lima, 1998; Gavioli, 1998) have shown that the oral acute (1h) or repeated (14 days bid) treatment of mice with the aqueous extract (AE) of *C. carthagenensis* promoted an anxiolytic-like effect as evaluated in the plus-maze test. Nevertheless, no changes in the locomotor activity as well as in the motor performance of the treated animals were observed. Moreover, no signs of central depression were registered in these animals.

The aim of this study was to better investigate this putative anxiolytic-like activity of the AE of *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. and its semi-purified fraction PPT-3 in the plus-maze test in mice. We also tried to check other central effects of the preparations, using complementary tests, and to study the underlying mechanism of this action, using antagonists of the cholinergic neuronal nicotinic receptors.

Male adult mice were acutely and repeatedly treated with the AE of *C. carthagenensis* (0.25, 0.5 e 1.0 p.o.) and evaluated in the plus-maze test. Both treatments promoted an anxiolytic-like effect and the repeated treatment did not cause a decrease in this effect, as expected to benzodiazepine-like compounds (tolerance phenomenon). We did not observe any alterations in the other complementary test used such as barbiturate-sleeping time, pentilenotetrazol- and

maximal electroshock- induced convulsions and rota-rod, indicating no resemblance with the benzodiazepine drugs.

On the other hand, Viel (1998) showed that the AE and the semi-purified fraction PPT-3 seemed to interact with the cholinergic nicotinic receptors in *in vitro* preparations. In this study, the treatment with neuronal nicotinic antagonists were able to revert the anxiolytic-like effect of AE evaluated in the elevated plus-maze.

Moreover, the acute treatment with the semi-purified fraction PPT-3 (0.1, 0.25, 0.5 g/kg *p.o.*) produced an anxiolytic-like effect just at 0.25 g/kg and none of all doses employed had an effect on the complementary tests.

Taken together, the results obtained in this study indicate that the AE of *C. carthagenensis*, and also the semi-purified fraction PPT-3, have biologically active constituents with an anxiolytic-like activity. This activity seems to involve, direct or indirectly, neuronal nicotinic receptors but its underlying mechanism of cellular action remains to be elucidated.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais

“Uma estreita relação entre os homens e as plantas consideradas curativas sempre existiu em todas as fases de desenvolvimento das várias civilizações. Provavelmente a tendência a utilizar plantas para tratamento dos seus males é inata no homem, como em outros animais. Estudos realizados na Tanzânia, com chimpanzés, verificaram que esses primatas deglutem em jejum folhas de certas plantas que os livram de vermes intestinais e arqueólogos encontraram em túmulos pré-históricos sementes de plantas tidas como medicinais. Até hoje os povos primitivos mantêm curandeiros cujas práticas envolvem manipulação de plantas ou produtos derivados de vegetais. Nos dias atuais assiste-se a um fenômeno tanto mais surpreendente quanto dele nem mesmo escapam as populações mais industrializadas: a intensificação do uso de plantas para fins medicinais. Questões de ordem sócio-econômica, de um lado, e o desconhecimento científico, de outro, explicam este fato” (Gottlieb, e Kaplan, 1993).

Ao se abordar o polêmico assunto relacionado a utilização de produtos naturais, aqui ressaltando as plantas medicinais, podemos fazer referência a esta prática como fonte única de recursos terapêuticos em regiões interioranas do Brasil, onde o acesso à saúde, de um modo geral, é difícil. Além desse aspecto, é comum observar a frenética utilização de produtos naturais (como as plantas

medicinais), numa parcela da população que tem acesso ao atendimento à saúde adequado, muitas vezes sustentada pelo modismo e por correntes naturalistas. Acrescenta-se a estes dois pólos opostos, os programas sociais, associações de bairros e comunidades alternativas, além de projetos diversos, escolares, universitários ou aqueles dirigidos por ONGs, onde é preconizada a utilização de plantas medicinais, inclusive com a criação e manutenção de hortos de plantas medicinais para fins terapêuticos.

De um modo geral, presume-se que 70 a 80% da população de países em desenvolvimento ainda se valem de práticas de medicina popular para o tratamento de suas doenças e a presença das plantas medicinais, em diferentes preparações, é preponderante (Lapa e col., 1997).

A partir da década de 50, onde até então o uso de medicamentos vegetais tinha quase que exclusividade, houve uma substituição gradativa desses medicamentos por princípios ativos deles extraídos, ou por seus derivados sintéticos, devido às dificuldades encontradas no controle de qualidade – químico, farmacológico ou toxicológico – dos extratos então utilizados. Em decorrência disto, apenas uma pequena parcela das plantas medicinais foi submetida a estudos científicos mais rigorosos com protocolos modernos. Isso implica em que a maioria das informações disponíveis são referentes à década de 50, ou seja, obsoletas frente ao estágio atual do conhecimento científico (Lapa e col., 1997 ; Farnsworth, 1993 ; Gaus e Högel, 1995; Clark, 1996).

Vale então, diante das considerações levantadas até aqui e diante da necessidade iminente de se validar as atividades atribuídas às plantas medicinais, frisar que “a idéia primordial na indicação do uso dos fitoterápicos na medicina

humana não é substituir medicamentos registrados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com espectro de ação mais adequado e, quiçá, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes, mas sempre em estrita obediência aos preceitos éticos que regem o emprego de xenobióticos na espécie humana. Objetivos secundários, mas não menos importantes, seriam a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato autóctone para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local” (Lapa e col., 1999).

Para se estabelecer o perfil farmacológico de uma droga, em processo que não deve diferir daquele empregado para plantas medicinais, é necessário uma experimentação cuidadosa e moderna, o que leva um longo período de tempo para se completar, além de um alto investimento. Os requerimentos legais para aceitação de um fitoterápico variam de acordo com os países e suas necessidades. Para alguns o uso tradicional é suficiente para garantir uma baixa toxicidade, enquanto outros sustentam a necessidade de uma avaliação crítica contando com resultados acumulados de experimentações científicas das últimas décadas (Lapa e col., 1997). Praticamente todos os países do mundo adotaram a Declaração de Helsinki e suas “Diretrizes éticas internacionais para investigação biomédica envolvendo seres humanos”. No Brasil, os quatro conceitos básicos (autonomia, não maleficência, beneficência e justiça) foram incorporados à resolução 1/88 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), Ministério da Saúde (MS), posteriormente substituída pela Resolução 196/96 (Brasil, 1996) que normatiza as

pesquisas nesta área visando o aprimoramento do conhecimento científico e a produção de insumos para o atendimento médico-hospitalar (Lapa e col., 1999).

É importante salientar, sob o ponto de vista da ética da utilização de medicamentos, segundo Lapa e col. (1999) que: “a planta medicinal utilizada como medicamento é um xenobiótico, isto é, um produto estranho ao organismo humano, nele introduzido com finalidades terapêuticas. Como todo corpo estranho, os produtos de sua biotransformação são potencialmente tóxicos, e assim devem ser encarados até prova em contrário. De fato, não há porque, *a priori*, considerar inócua uma planta medicinal, se do reino vegetal são obtidas substâncias extremamente tóxicas como a estricnina, a digitoxina, os curares e os heterosídeos cianogênicos”.

A este respeito, o cientista russo Semenov ao relacionar em ordem decrescente de citotoxicidade uma grande quantidade de substâncias que permaneciam ainda bioativas numa diluição 10^{-8} M (presentes, portanto, numa ínfima quantidade de solução aquosa), o que resultou em que as 36 primeiras são substâncias naturais, ou seja, presentes em plantas ou animais. Os norte-americanos Rosenkrans e Klopman, compararam a atividade carcinogênica de centenas de substâncias, dentre as quais não encontraram diferença significativa entre as sintéticas e as naturais: aproximadamente 40% de cada um dos dois grupos mostrou atividade (*apud* Gottlieb e Kaplan, 1993).

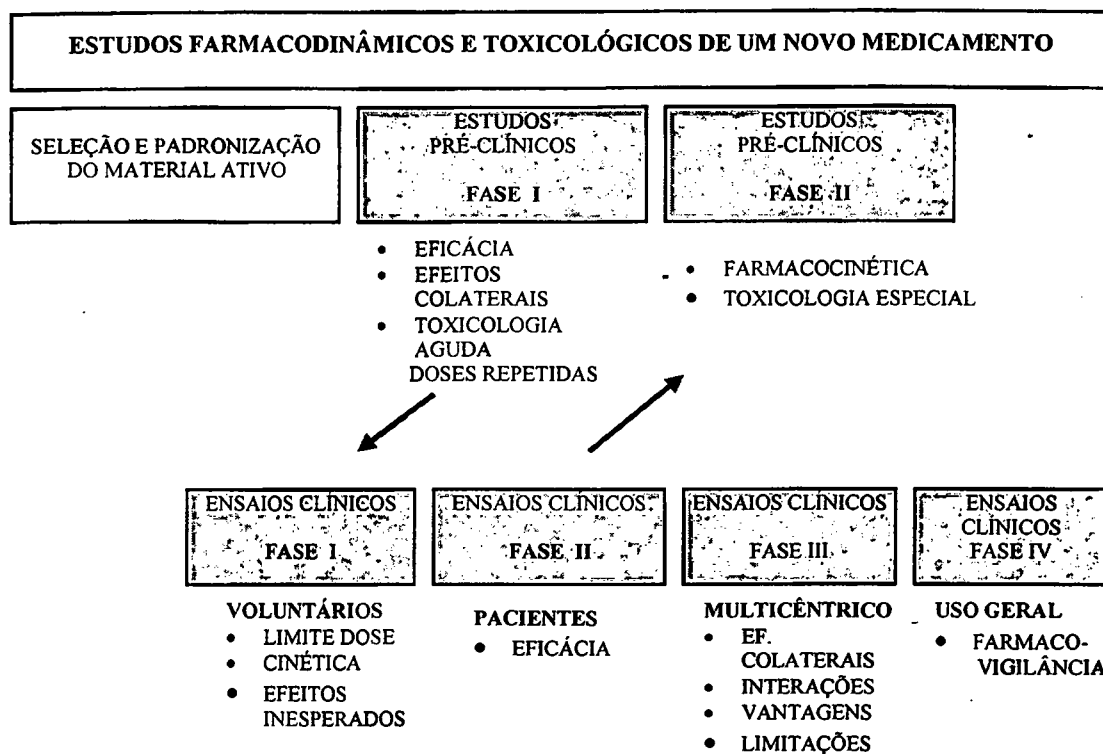
Ao se analisar a efetividade de um infuso, tintura ou cápsula de uma ou várias plantas medicinais, é preciso considerar que o efeito obtido pode ser devido a uma ação placebo de substâncias inertes, eficazes no estresse, na hipertensão, nas palpitações, na ansiedade, na dispnéia, nas úlceras gástricas e nas dores as

mais variadas, ou na “cura” de distúrbios auto-limitados como diarreias, vômitos, tosses, resfriados e cólicas, ou ainda, de sintomas mal definidos como indisposição geral, astenia, nervosismo e males do fígado. Deve-se também ponderar que a auto-sugestão e a esperança de cura podem aliviar sintomas e induzir o paciente a desconsiderar sinais importantes, retardando o atendimento médico em patologias graves, como no câncer de mama, com conseqüências, às vezes, irremediáveis. Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar que uma planta medicinal ou um fitoterápico não têm somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com a sua ingestão, mas, principalmente efeitos que se instalam a longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos, a exemplo do que ocorreu recentemente no Brasil com os extratos do confrei (*Symphytus officinale* L.) (Lapa e col., 1999).

Fica, assim, claro que, embora a utilização de plantas medicinais ocorra em grande escala como medicamentos, uma quantidade muito pequena delas está sendo criteriosamente estudada de acordo com os padrões científicos e éticos aceitos internacionalmente. Podemos concluir, portanto, que estas plantas só podem ser consideradas medicamentos éticos a partir do momento em que é definida sua eficácia, conhecida a sua toxicidade e seu controle de qualidade possa ser realizado. Para que se atinja esse objetivo, o protocolo que caracteriza os fitomedicamentos é bem definido e não difere daquele recomendado para compostos sintéticos.

O processo para o estudo e desenvolvimento de medicamentos (entre eles as plantas medicinais) e algumas razões para a validação de plantas medicinais encontram-se nas esquemas 1 e 2.

Esquema 1 - Estudos farmacodinâmicos e toxicológicos para um novo medicamento (retirado de Lapa e col., 1997).



Esquema 2 – Razões para validar as plantas medicinais.

- **Necessidades Sociais**

Mais informações científicas a curto prazo para os usuários de plantas da medicina popular.

- **Pesquisa Terapêutica**

Descoberta de novos medicamentos com atividades farmacológicas inovadoras, além de determinação do perfil farmacológico e de seus mecanismos de ação.

- **Inconsistência Botânica**

Para conhecer a variabilidade química de plantas de mesma espécie que crescem em diferentes condições ecológicas.

- **Requerimentos Éticos**

Para avaliar as consequências farmacológicas / toxicológicas desconhecidas após curta ou longa utilização de um determinado medicamento, garantindo a segurança do seu uso.

- **Benefícios Econômicos**

Para fortalecer o mercado regional com fitomedicamentos padronizados de alta aceitação, dando condições para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local.

- **Objetivos Acadêmicos**

Para o desenvolvimento dos países menos desenvolvidos é necessário um suporte tecnológico / científico para avaliação de novos medicamentos, formação de especialistas e fortalecimento da vigilância sanitária orientada para a definição das políticas de saúde.

Adaptado de Lapa e col. (1997).

Cuphea carthagenensis

A *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr., é uma planta pertencente à família Lythraceae, cujo nome, segundo Hoehne (1939), derivou da palavra “Lythrum” que significa “sangue derramado” ou “sangue coagulado”, tendo esse nome sido introduzido por Dioscórides para classificar todos os seus representantes. A origem do nome do gênero *Cuphea* vem do grego “Kuphos” e significa giba, devido a base gibosa do cálice (Sete-sangrias, 2000).

As plantas desta família apresentam como características principais folhas simples e opostas, caulículos dispostos em ângulos retos, flores em forma cálice ou tubulares, com pétalas de aspecto amarrotado inseridas no bordo do cálice, estames fixos dentro da corola, geralmente organizados em duas espirais. Possuem, ainda, ovário superior livre, com placentação axial, fruto seco, do tipo cápsula, inserido no persistente tubo floral e um número básico de cromossomos $X = 8$ (Oka e Roperto, 1998; Graham, 1998a).

Entre outros gêneros que constituem a família das Litráceas, o gênero *Cuphea* é o seu maior representante, compreendendo ao redor de 250 espécies que, em sua maioria, vive em lugares úmidos. Sua origem é centro - sul americana, com bastante representatividade no Brasil. Muitas espécies ocorrem como infestantes, mas são raras as situações em que a intensidade das infestações é grande. Muitas plantas do gênero *Cuphea* são conhecidas popularmente como “sete-sangrias”, numa alusão a que o tratamento com essas plantas equivale ao resultado obtido por sete sangrias (tratamento comum no

passado para “pressão alta”). Atualmente, há um grande interesse em estudar a viabilidade de se explorar comercialmente plantas do gênero *Cuphea* melhoradas ou geneticamente alteradas pela capacidade destas plantas de produzir ácidos graxos de cadeias médias e curtas (com 8, 10 e 12 carbonos), que são armazenados nas sementes em combinação com glicerol, com possibilidades de uso como lubrificantes sintéticos e plastificantes (Sete-sangrias, 2000).

A *C. carthagenensis* é uma planta anual, herbácea, ereta e ramificada (Figura 1). Possui caule avermelhado com abundante pilosidade glandulosa. Mede entre 20 e 60 cm e se reproduz por sementes. As folhas são opostas, curto-pecioladas, oblongo-lanceoladas de ápice e base agudos, possuindo até 5 cm de comprimento. Possuem a face inferior levemente mais clara e com pubescência mais pronunciada que a superior. São ainda, membranosas, ásperas, glabras e perinervadas. Suas inflorescências são axilares, dispostas em cachos com pequenas flores de coloração violácea ou avermelhada. As flores são formadas por duas pétalas dorsais menores que as outras, contendo onze estames (Corrêa, 1975; Lorenzi, 1991). Os frutos da *C. carthagenensis* são em forma de cápsula, contendo 4 a 8 sementes (Figura 2). Algumas sinonímias científicas desta planta já descritas são: *Balsamona pinto* Vand., *Cuphea balsamona* Cham. & Schltd., *Cuphea divaricata* Pohl ex Koehne, *Cuphea elliptica* Var. ex Koehne, *Cuphea pepiidioides* Marx ex koehne, *Cuphea pinto* Kohne, *Cuphea hyssopifolia* Cham., *Cuphea ingrata* Cham., *Lythrum carthagenense* Jacq., *Parsonsia balsamona* (Cham. & Schltd.) Standl., *Parsonsia pinto* A. H. Heller (Coimbra, 1958; Lorenzi, 1991; w3 Tropicos, 1997).

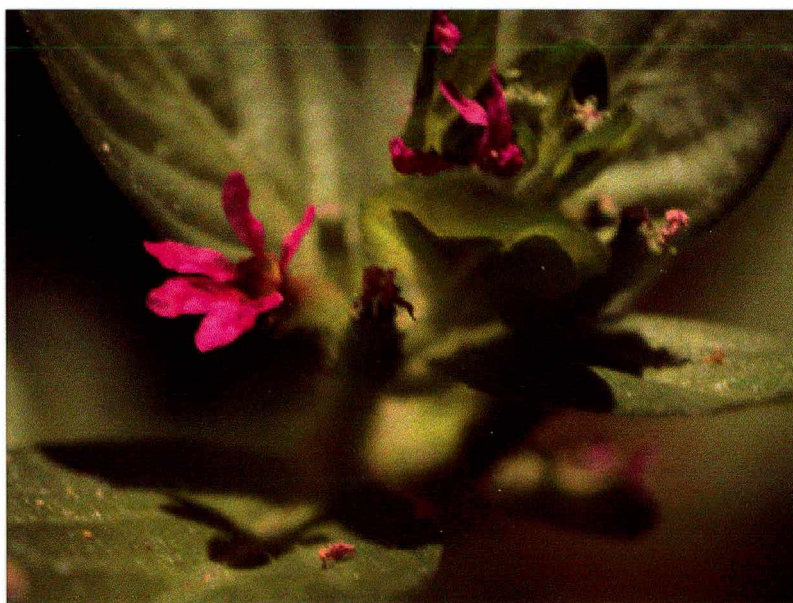
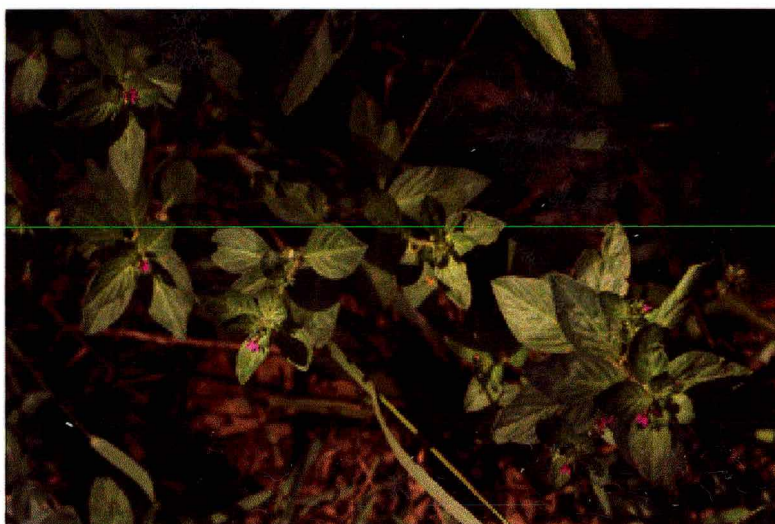


Figura 1 - *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. (Herbarium Cris Oka, 2000).

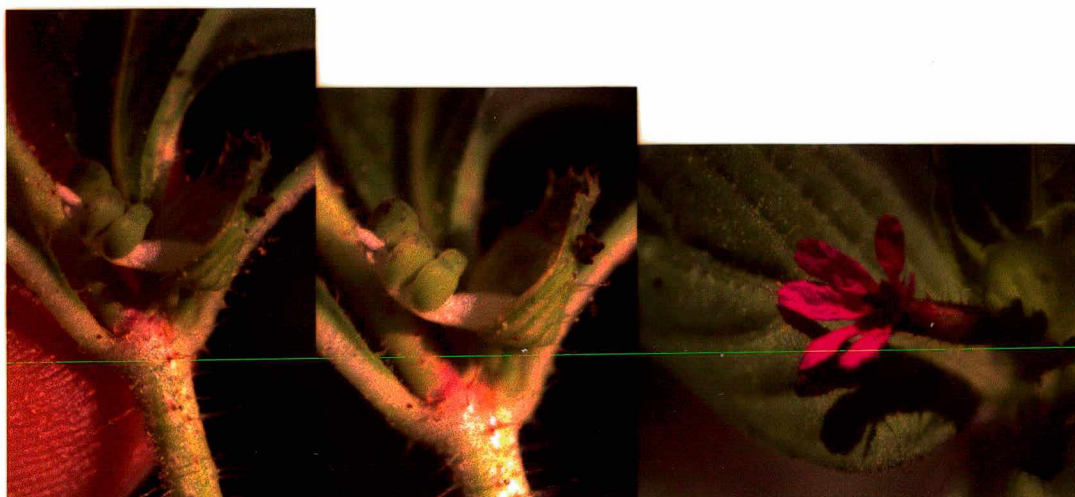


Figura 2 – Detalhes do caule, frutos e flor de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr (retirado de Herbarium Cris Oka, 2000).

A *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. utilizada neste trabalho é conhecida como sete-sangrias, guanxúma-vermelha ou cuféa, sendo popularmente utilizada como anti-hipertensiva, na arteriosclerose, para as palpitações e para fortalecer o coração. É usada também no reumatismo e doenças de estômago e intestino. A ela são atribuídas propriedades diaforéticas, depurativas, laxativas, diuréticas, anti-sifilíticas e depressoras do sistema nervoso central (De Lima e col., 1999). É utilizada no tratamento da gonorréia, hemorróidas e malária, no combate ao colesterol, limpeza das rins, afecções da pele e doenças venéreas, e por suas propriedades balsâmicas é também utilizada como atenuante de inflamação das mucosas (Herbarium Cris Oka, 2000; *Cuphea*, 2000). Como diaforética é também utilizada nas febres intermitentes (Hoehne, 1939; Dieseldorff, 1940; Coimbra, 1958; Corrêa, 1975; Lorenzi, 1991).

Todas as partes da planta (raiz, caules, folhas e flores) são utilizadas no preparo de chás e estes são usados de forma crônica (Corrêa, 1975; Lorenzi, 1991). As formas farmacêuticas habituais para a utilização desta planta são infuso, decocto, extrato fluido, tintura, elixir, vinho, xarope, etc. Quando consumido em excesso, porém, o chá desta planta pode causar diarreia (Coimbra, 1958; Oka e Roperto, 1998).

As propriedades medicinais da *C. carthagenensis* são atribuídas a seu óleo essencial. Segundo o banco de dados *Phytochemeco Database* (1998), ela possui ácido betulínico, ao qual é atribuído atividade antiinflamatória, antiviral e antitumoral (Recio e col., 1994; Fujioka e col., 1994; Harbone e Baxter, 1983).

Do mesmo modo como ocorre com as outras espécies, o óleo essencial da *C. carthagenensis* é rico em triglicérides de cadeia média, como o ácido láurico (81,4%), ácido cáprico (5,3%) e ácido mirístico (4,7%) (Kleimann, 1990). Além destes compostos, essa planta é rica em manitol, β -sitosterol, β -amirina, stigmasterol, ergosterol, ácido ursólico e os triterpenos epifriedelinol e 3 β -hidroxifriedel-7-ene, um novo triterpeno natural denominado carthagenol (Gonzáles e col., 1994).

Entre os flavonóides presentes nas *Cupheas*, destacam-se os glicosídeos de apigenina, O-glicosídeos de luteolina, O-glicosídeos de quercetina, O-glicosídeos de rhamnetina, O-glicosídeos de isorhamnetina, O-glicosídeos de miricetina e as agliconas quercetina e miricetina (Santos e col., 1995, Daros e col., 1996).

Os resultados obtidos com a *Cuphea aperta* Koehne mostram uma potenciação do sono induzido por barbituratos (Santos, 1987) e uma depressão do sistema nervoso central foi observada após o tratamento com a *Cuphea balsamona* Cham. & Schltd (Ericeira e col., 1984). Além disso, estudos preliminares com a própria *C. carthagenensis*, procedidos no Laboratório de Neurofarmacologia – CCB – UFSC, mostraram, em camundongos, uma atividade do tipo ansiolítica promovida pelo extrato aquoso dessa planta sem apresentar efeito protetor das convulsões induzidas por pentilenotetrazol ou por eletrochoque máximo, e sem modificar a atividade exploratória ou coordenação motora desses animais (De Lima, 1998; Gavioli, 1998). Estas evidências somadas à necessidade de se realizar um estudo desta planta que se enquadrasse nos moldes mais modernos e éticos relacionados ao estudo de plantas medicinais, levou ao presente trabalho na tentativa de colocar a *C. carthagenensis* no rol das plantas medicinais que poderão, após os vários níveis de estudo, ser disponibilizadas, isentas de riscos ou com riscos controlados, ao uso terapêutico.

Ansiedade

Etimologicamente, a palavra ansiedade provém do grego *anshein*, que significa estrangular, sufocar, oprimir. O termo correlato angústia, origina-se do latim, onde a mesma palavra exprime desconforto, enquanto *angor* significa opressão ou falta de ar e *angere*, causar pânico. Todos estes termos referem-se metaforicamente à experiência subjetiva característica da ansiedade e a palavra “pânico”, relaciona-se com o deus Pan, que inspirava terror, assim como o deus grego Phobos, origem do termo fobia (Graeff, 1996).

Em pessoas sadias normais a resposta de estresse é provocada por uma ameaça ou um desafio real, sendo usada, através de uma ação apropriada, na solução da situação enfrentada. A ansiedade, no entanto, é uma reação de alerta excessivo, desproporcional à situação enfrentada, ou na ausência de um estímulo detectável, sendo caracterizada por sentimentos de apreensão, incerteza e medo, geralmente acompanhados de sintomas físicos. Fisicamente, a ansiedade é expressa por respostas fisiológicas que incluem hipertensão arterial, taquicardia, taquipnéia e aumento na tensão muscular, além de redução no fluxo sanguíneo intestinal que pode resultar em náuseas ou diarreia. Os distúrbios de ansiedade são geralmente produzidos por uma combinação de condições psicológicas, físicas e genéticas. Um dos fatores causais parece ser um desbalanço entre neurotransmissores no sistema límbico e outras estruturas a ele relacionadas, no qual a terapia medicamentosa está baseada. Vários estudos têm mostrado uma hiperatividade noradrenérgica no loco cerúleo (núcleo do sistema nervoso central – SNC, que constitui um sistema primitivo de alerta do organismo, preparando-o para a resposta ao perigo – “luta ou fuga”). Observa-se também uma redução na atividade GABAérgica e um aumento na atividade serotoninérgica na região septo-hipocampal (áreas do sistema límbico que reconhecem o perigo específico, o que envolve processos de aprendizagem e memória). Na verdade, atualmente algumas áreas do cérebro estão sendo associadas a distúrbios de ansiedade específicos, como no caso do corpo estriado e o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), da amígdala e o transtorno de ansiedade generalizado (*generalized anxiety disorder* - GAD) e ataques de pânico (Brawman-Mintzer e Lyard, 1997 ; Rickel e Schweizer, 1997).

A Associação de Psiquiatria Americana (APA) através da quarta edição de seu manual de diagnóstico para doenças psiquiátricas, o DSM-IV editado em 1994, tenta normatizar a classificação e facilitar o diagnóstico das diversas manifestações de ansiedade na seção que trata de transtornos de ansiedade (Lopes, 1997).

Tabela 1 - Classificação dos transtornos de ansiedade segundo o DSM-IV.

Agorafobia sem história de transtorno de pânico
Transtorno de pânico
Com agorafobia
Sem agorafobia
Fobia social
Fobia específica
Transtorno obsessivo-compulsivo
Transtorno de estresse pós-traumático
Transtorno de estresse agudo
Transtorno de ansiedade generalizada
Transtorno de ansiedade devido a uma condição médica geral
Transtorno de ansiedade induzido por substâncias químicas
Transtorno de ansiedade sem outra especificação

O DSM-IV mantém a orientação descritiva da edição anterior (DSM-III), pautando a classificação em diretrizes baseadas na apresentação clínica dos transtornos, criteriosamente detalhadas. Alguns dos transtornos mais frequentes e citados serão descritos abaixo.

O transtorno de pânico caracteriza-se pela ocorrência repetida de ataques de pânico. Estes podem ser definidos como episódios, auto-limitados, de extrema apreensão ou medo e sensação de perigo iminente para a integridade física ou mental, acompanhados de sintomas vegetativos sugestivos de hiperatividade central e autonômica. A agorafobia, ou esquiva agorafóbica caracteriza-se pelo comportamento de se evitar diversas situações públicas, receio de afastar-se de casa ou das pessoas que representem segurança, onde a preocupação prevalente em pacientes agorafóbicos é a de algum mal estar ou descontrole em locais aonde sair seja difícil ou embaraçoso (Ramos e Bernik, 1997).

As fobias, por sua vez, são divididas em social e específicas, onde a fobia social é o temor de ser observado por outros, da avaliação negativa por parte de outras pessoas, de ter mau desempenho em situações de interação social, ocorrendo sintomas autonômicos de ansiedade, com piora do desempenho em situações sociais e esquiva destas situações. As fobias específicas ou simples são definidas como medos irracionais associados com esquiva de estímulos específicos ou situações determinadas, que interferem com a vida e as atividades de uma pessoa, por exemplo, animais, altura, trovão, escuridão, lugares fechados, avião, visão de sangue, etc (Castel e Scalco, 1997).

O transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), segundo o DSM-IV, é caracterizado por obsessões, que seriam pensamentos impulsivos ou imagens persistentes, que são intrusas, desagradáveis e inadequadas e causam acentuada ansiedade ou mal estar, e compulsões, que seriam comportamentos repetitivos (por exemplo, lavar as mãos, ordenar, verificar) ou atos mentais (por exemplo, orar, contar, repetir palavras em silêncio), cujo objetivo é

neutralizar/reduzir ou prevenir a ansiedade e o desconforto emocional, não sendo em si atos que causem prazer ao indivíduo (Torres, 1997).

O conceito de transtorno de estresse pós-traumático (TEPT) é utilizado para descrever não apenas o complexo de sintomas que ocorre após a exposição a eventos traumáticos graves (torturas, estupros, experiências de combate e desastres naturais), como preconizado no DSM-III-R, mas também o decorrente da exposição a acidentes automobilísticos, transtornos clínicos agudos e crônicos, estresse de trabalho e desastres ocasionados pelo homem, como descrito no DSM-IV. O transtorno agudo de estresse (TAE), presente no DSM-IV, tem sua definição idêntica ao TEPT, mas sua duração deve ser de no mínimo 2 dias e no máximo 4 semanas, ocorrendo logo após o evento traumático (Maurat e col., 1997).

O transtorno de ansiedade generalizada (TAG ou *generalized anxiety disorder* - GAD) é um distúrbio crônico de ansiedade, caracterizado por preocupações irreais ou excessivas, com diversos sintomas somáticos. O aspecto essencial é a preocupação constante, concomitante a sintomas somáticos e psíquicos persistentes (Nardi e col., 1997).

O “distúrbio de ansiedade devido a uma condição médica geral” é a presença de sintomas ansiosos clinicamente significativos, cuja associação com outra condição clínica geral possa ser comprovada através de histórico clínico, exames físicos ou achados laboratoriais. A sintomatologia pode ser indicada através dos especificadores: TAG, TOC ou pânico. O “transtorno de ansiedade induzido por substâncias” se caracteriza por sintomas proeminentes de ansiedade, considerados como decorrentes dos efeitos fisiológicos diretos de uma

substância (droga de abuso, medicamento ou exposição a toxina) e a sua sintomatologia pode se dar pelo TAG, pânico, TOC, ou com sintomas fóbicos (Lopes, 1997).

Tratamento

O uso de medicamentos para o tratamento da ansiedade é tão antigo quanto a história da Medicina, mas foi o advento dos benzodiazepínicos (1959) e sua eficácia em tratar a ansiedade que levou a um melhor entendimento dessa psicopatologia, implicando definitivamente o ácido gama-aminobutírico (GABA) na sua fisiologia. Algumas drogas que afetam a noradrenalina e a serotonina, como os antidepressivos, são também eficazes em tratar vários distúrbios de ansiedade, fortalecendo a hipótese do envolvimento desses neurotransmissores nessa psicopatologia. Atualmente a abordagem terapêutica mais efetiva para a maioria dos distúrbios de ansiedade consiste numa combinação de terapia cognitiva-comportamental e medicação (De Lima, 2000).

Outras drogas, como os bloqueadores dos adrenocetores β , como o propranolol (Inderal®) e o atenolol (Atenol®), reduzem os componentes autonômicos da ansiedade, como taquicardia e diaforese. São úteis em algumas fobias (ansiedade de performance) e em patologias cardíacas, endócrinas e outras condições médicas associadas ao estresse e ansiedade. A clonidina (Atensina®), agonista β_2 -adrenérgico, tem sido usada no tratamento do distúrbio de estresse pós-traumático, mas apresenta efeitos colaterais importantes” (De Lima, 2000).

Drogas antagonistas de receptores serotoninérgicos 5-HT₂ (ritanserina) e 5-HT₃ (ondansetron) também vêm sendo usadas na terapêutica das ansiedades.

Outros moduladores do receptor GABA estão sendo testadas na tentativa de obter uma maior seletividade de ação e menos efeitos colaterais. Drogas seletivas que atuam em receptores de aminoácidos excitatórios como o glutamato e neuropeptídeos (colecistocinina, substância P, neuropeptídeo Y, CRF, opióides...) são também possibilidades futuras na abordagem terapêutica da ansiedade (De Lima, 2000). Estas drogas, porém, necessitam de uma melhor caracterização de seus efeitos e a reprodução dos mesmos para que venham somar-se aos benzodiazepínicos no tratamento dos diversos transtornos de ansiedade.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Estudos preliminares com a própria *C. carthagenensis*, procedidos no Laboratório de Neurofarmacologia – CCB – UFSC, mostraram, em camundongos, uma atividade do tipo ansiolítica promovida pelo extrato aquoso dessa planta, sem, no entanto proporcionar proteção às convulsões induzidas por pentilenotetrazol ou por eletrochoque máximo, não alterando a atividade exploratória ou coordenação motora desses animais (De Lima, 1998; Gavioli, 1998).

O presente trabalho objetivou aprofundar esses estudos da atividade do extrato aquoso (EA) e de uma fração semi-purificada da *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. (sete-sangrias) no Sistema Nervoso Central de camundongos. Em especial, foi dada ênfase à investigação e à caracterização da atividade do tipo ansiolítica.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Material Botânico

A planta foi fornecida pelo Prof. Dr. Antonio José Lapa (EPM / UNIFESP) de material obtido de culturas controladas do banco de germoplasma do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), em Campinas, SP, sob a supervisão dos Drs. Pedro Mellilo Magalhães e Ileo Montanari. As folhas foram secas à temperatura ambiente e enviadas ao Setor de Produtos Naturais (SPN), Instituto de Farmacologia INFAR, da Escola Paulista de Medicina (EPM) / Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), aonde os extratos foram preparados. Uma excicata da *Cuphea carthagenensis* encontra-se catalogada no herbário do CPQBA sob o número 221.

Preparo do Extrato Aquoso (EA)

As amostras da planta foram secas e pulverizadas em moinho mecânico. O extrato aquoso (EA) à 2% foi obtido por infusão do pó da planta total à 72°C e mantido sob agitação, por 30 minutos. O EA foi posteriormente filtrado e concentrado à vácuo, a 50° C, liofilizado e armazenado em frascos âmbar, em dessecador. O peso seco do EA foi determinado em três alíquotas de 1 mL do extrato concentrado. Após evaporação da água em estufa a 100° C, determinou-se os pesos dos resíduos secos em balança analítica. Esse procedimento foi repetido três vezes para cada alíquota contendo o EA. Após a estabilização dos

pesos secos foi calculada a média das três amostras. Para o cálculo do rendimento (%), tomou-se a quantidade do pó (g) utilizado na extração, o peso seco de alíquotas (mg/mL) e o volume total do concentrado, obtendo-se um rendimento de 15%.

Fracionamento do extrato aquoso

O pó liofilizado da planta foi adicionado à água na concentração de 10% e feita uma solubilização fracionada em centrífuga refrigerada (2.000 rpm a 4° C, por 20 min). Após cada centrifugação, o precipitado foi separado do sobrenadante e re-suspenso em água destilada para a próxima centrifugação. Após a terceira centrifugação, o precipitado resultante foi concentrado, liofilizado e denominado de "PPT-3".

A realização dos procedimentos de preparo do extrato aquoso, bem como o seu fracionamento, se deu na UNIFESP/EPM no Setor de Produtos Naturais do INFAR, por Tânia Araújo Viel, sob a supervisão da Dra. Luce M. Brandão, e o extrato aquoso e a fração semi-purificada PPT-3 para a realização deste trabalho foram gentilmente enviados pelo Dr. Antonio J. Lapa (EPM/UNIFESP).

Animais

Foram utilizados cerca de 400 camundongos Suíços machos (3 meses de idade), pesando entre 25 e 35 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos, até o momento dos experimentos, no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia. A temperatura

ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e o ciclo de luz claro/escuro de 12 h (luz das 6:00 às 18:00 h), foram controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração, exceto durante a realização dos experimentos. Os grupos controle e experimentais ($n = 4 - 12$ para cada grupo) foram escolhidos aleatoriamente. Cada animal foi utilizado somente uma vez.

Drogas e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- Citrato de metilcaconitina (Research Biochemicals International Natick, MA, USA) - diluído em PBS ("phosphate-buffered solution"): NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) e administrado por via i.c.v., numa concentração de 30 nm/2 μ L por animal.
- Cloridrato de mecamilamina (Research Biochemicals International Natick, MA, USA) - diluído em solução salina (0,9% de NaCl) e administrado por via i.p., num volume de 10 mL/kg, na dose de 15 μ mol/kg.
- Diazepam (Dienpax[®] – Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil - ampolas 10 mg/2ml diluídas em solução salina (0,9% de NaCl) e a solução final administrada por via intraperitoneal (i.p.), num volume de 10 mL/kg, nas doses de 0,5 , 1,0 e 2,5 mg/kg.
- Pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), antagonista GABAérgico (Olsen, 1981) - diluído em solução salina (0,9%

de NaCl) e administrado por via i.p., num volume de 10 ml/kg, na dose de 80 mg/kg.

- PBS - solução fosfato tamponada ("phosphate-buffered solution"): NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM (Sigma Co., St. Louis, MO, USA).
- Pentobarbital sódico (Nembutal[®], Lab. Abbott, São Paulo, Brasil), gentilmente doado pelo Dr. Antonio J. Lapa (EPM/UNIFESP).

Administração das drogas

O EA e o PPT-3 foram administrados por via intragástrica (*per oros*, p.o.) uma hora antes dos testes, para o tratamento agudo e durante 14 dias anteriores aos testes *bid*, para o tratamento repetido.

As drogas: pentilenotetrazol (80 mg/kg), pentobarbital sódico (50 mg/kg) diazepam (1,0 mg/kg) e mecamilamina (15 μ mol/kg) foram administradas por via intraperitoneal (i.p.). Os grupos controles foram tratados com solução salina (NaCl 0,9%; 0,1 ml/10 g de peso), pela mesma via.

A técnica empregada para a administração da metilcaconitina, antagonista de receptores nicotínicos neuronais foi a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) "free hand", desenvolvida por Haley e McCormick (1957) e modificada por Laursen e Belknap (1986). Os animais foram anestesiados com éter e a agulha posicionada num plano inclinado (90°) em relação ao crânio com seu bisel voltado para cauda do animal. Uma linha imaginária foi traçada rostralmente em relação as orelhas dos animais, introduzindo-se a agulha 3,5 mm no sentido dorso-ventral e aproximadamente 2 mm lateralmente à linha mediana. A injeção foi realizada com

o auxílio de uma micro-seringa Hamilton 701 N (10 µl), conectada a um tubo de polietileno (PE 20; Plastics One Inc., Virginia, EUA) de 15 cm de comprimento. A agulha (13 x 4,5; 26G1/2; Becton Dickinson Ind. Cirúrgicas Ltda., Curitiba, PR), empregada para injeção i.c.v. estava conectada à outra extremidade do tubo de polietileno. A metilcaconitina foi injetada na dose de 30nM (2 µl). O grupo controle foi tratado, pela mesma via, com o mesmo volume de veículo (PBS).

Ao fim das observações comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e a localização correta da injeção i.c.v. foi verificada, *a fresco*, com o auxílio dum bisturi. O cérebro de cada animal foi cortado no plano coronal e verificamos se a posição da cicatriz deixada pela agulha injetora coincidia com a localização de qualquer um dos ventrículos laterais. Os resultados obtidos com animais cuja a localização da injeção estava incorreta e/ou ainda daqueles que apresentaram sinais de hemorragia foram descartados.

Procedimentos gerais

Todos os experimentos foram realizados entre 8:00 e 13:00 h. Os animais eram deslocados do Biotério Setorial para o biotério do laboratório com (no mínimo) 24 h de antecedência, período de tempo este que também era o da última manipulação desses animais, tais como troca da cama de serragem, marcação dos mesmos, etc. No dia de cada experimento os animais foram habituados às condições experimentais em uma ante-sala no próprio laboratório por um período de, pelo menos, 1 h antes do início de cada experimento. Os aparelhos utilizados

estavam numa sala iluminada somente com uma luz vermelha de 15 w, na qual a temperatura foi mantida a 22 ± 1 °C.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE foi construído em acrílico, de acordo com as especificações de Lister (1987). Sucintamente, o aparelho consiste de dois braços abertos opostos (30 x 5 cm) cruzados em ângulo reto com outros dois braços do mesmo tamanho, cercados por uma parede de acrílico transparente de 15 cm de altura (braços fechados). O assoalho do aparelho é de acrílico preto. Para evitar a queda dos animais, uma borda de 0,25 cm de altura cerca os braços abertos. O aparelho está elevado a 45 cm do nível do chão. Os quatro braços delimitam uma área central de 5 x 5 cm, designada como plataforma central. Antes de cada animal ser avaliado, o aparelho era limpo com uma solução de etanol a 10% e seco com papel toalha. Os animais eram testados no LCE por 5 min.

No LCE, foram registrados os parâmetros clássicos: frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, a frequência de entradas nos braços fechados e a frequência total de entradas, obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e nos braços fechados. Foi considerada como entrada em um dos braços quando o animal colocou as quatro patas dentro do respectivo braço (Rodgers e col., 1997). Para análise estatística dos dados e para a elaboração dos gráficos a percentagem de entradas nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entradas nos braços abertos pela frequência total de entradas e este índice foi multiplicado por cem

$([A/A + F] \times 100)$. De maneira similar, calculou-se a porcentagem de tempo que os animais permaneceram nos braços em relação ao somatório de tempo de permanência nos braços abertos e fechados $([TA/TA + TF] \times 100)$; (Handley e Mithani, 1984; Pellow e col., 1985; Lister, 1987; Treit e col., 1993; Cruz e col., 1994). De uma maneira geral, drogas/situações ansiolíticas aumentam o número de entradas e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos, enquanto drogas/situações ansiogênicas promovem efeitos opostos (Handley e Mithani, 1984; Pellow e col., 1985). Outros parâmetros, conhecidos como etológicos, tais como os números de comportamentos de estiramentos (*stretch attend posture*), imersões de cabeça (*head dipping*), levantamentos (*rearing*), auto-limpeza (*grooming*), além do número de bolos fecais, também foram registrados neste modelo (Rodgers e col., 1997)

Convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol (PTZ)

Decorridos 60 min. do tratamento com o extrato da planta ou com o PPT-3, os camundongos foram injetados com pentilenotetrazol (PTZ, 80 mg/kg, i.p.) e, em seguida, colocados em gaiolas de vidro para as observações. O tempo para manifestação da primeira convulsão (latência), assim como a duração e a incidência das convulsões foram observadas e registradas até 30 min após a injeção de PTZ (Swinyard e col., 1952).

Convulsões por eletrochoque transcorneal máximo (ECM)

Sessenta minutos após o tratamento com o extrato aquoso da planta e com o PPT-3, os camundongos foram submetidos ao eletrochoque transcorneal

máximo (60 Hz, 50 mA, 0,2 s). O tempo de flexão, o tempo de extensão e o de recuperação das convulsões induzidas foram registrados (Swinyard e col., 1952).

Sono induzido por barbitúrico

Os grupos de camundongos receberam o tratamento com o extrato aquoso da planta ou PPT-3 60 min antes da administração intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). A latência e a duração da perda do reflexo postural dos animais após a injeção do barbitúrico, foi registrada por um período máximo de 180 min consecutivos (Carlini e col., 1986).

Campo Aberto (CA) ou Arena de Atividade

Os grupos de animais, 60 min após terem sido tratados com o extrato aquoso da planta ou PPt-3 ou mecamilamina (em seguida à exposição ao LCE ou em experimentos isolados) foram colocados, individualmente, no centro de um campo aberto confeccionado em acrílico (paredes transparentes e chão preto, 30 x 30 x 15 cm). Para avaliar a atividade exploratória dos animais foram registradas a movimentação espontânea dos animais (número de cruzamentos, com as quatro patas, entre as divisões do campo), o número de comportamentos de auto-limpeza ("grooming"), de levantar ("rearing") e a sua defecação, durante um período de 5 min (Archer, 1973; Siegel, 1946). A tendência natural do animal perante um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado por este novo ambiente (Montgomery, 1955).

Rota-rod (RR)

A coordenação motora dos animais ,submetidos ao tratamento com o EA da planta, foi avaliada no teste do rota-rod originalmente desenvolvido por Dunham e Miya (1957) e adaptado por Carlini e col. (1986). O aparelho consiste de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, dividida em seis compartimentos, elevada a 25 cm de altura, que gira a 12 r.p.m. Vinte e quatro horas antes do teste os animais foram testados em sessões de 1 min, sendo selecionados aqueles que permaneceram na barra giratória todo o tempo de duração da sessão. Os animais foram ,então, passados 60 min. do tratamento, submetidos ao teste, em sessões de 1 min de duração. Foram registrados, durante a sessão de teste, o tempo de permanência na barra giratória (em segundos) e o número de quedas do aparelho.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro-padrão da média (e.p.m.). Cada valor reflete a média de 4 - 12 animais por grupo nos testes realizados. Os resultados (curvas dose-resposta) foram tratados pela análise de variância univariada, tendo como variável independente o fator tratamento, seguida pelo teste de Dunnett. Para análise do efeito isolado da mecamilamina foi utilizado o teste "t" de Student (bicaudal não pareado) . Quando $p < 0,05$, as diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes.

RESULTADOS

RESULTADOS

Efeito do tratamento agudo com diazepam

Objetivos:

Validar o teste do LCE, estabelecendo o efeito ansiolítico do diazepam no labirinto em cruz elevado, para escolha de uma dose dessa droga padrão a ser utilizada nos experimentos posteriores.

Resultados:

A figura 1 mostra a frequência de entradas nos braços abertos (A) e o tempo de permanência nesses mesmos braços em relação ao tempo total (B), expressos em porcentagem do grupo controle. A injeção i.p. de diazepam alterou significativamente ($p < 0,05$) alguns parâmetros observados no LCE, como o esperado para drogas que exercem um efeito do tipo ansiolítico: aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos nas doses de 1,0 mg/kg e 2,5 mg/kg ($198 \pm 19\%$ e $127 \pm 43\%$, respectivamente) e o tempo de permanência nos braços abertos na dose de 1,0 mg/kg ($411 \pm 69\%$).

Na figura 2 estão os dados referentes ao número de entradas nos braços fechados (A), número de entradas totais (B) e o número de imersões de cabeça (C). A injeção i.p. de diazepam elevou significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros referentes ao número de entradas totais e imersões de cabeça nas doses de 1,0 mg/kg e 2,5 mg/kg ($83 \pm 15\%$ e $134 \pm 38\%$, respectivamente).

Os demais parâmetros comportamentais observados são apresentados na Tabela 1, onde o único parâmetro alterado significativamente ($p < 0,05$) pelo tratamento o número de estiramentos (*stretch attend postures* - SAP) que nas doses de 1,0 e 2,5 mg/kg de DZP foi reduzido ($53 \pm 7\%$ e $61 \pm 11\%$, respectivamente).

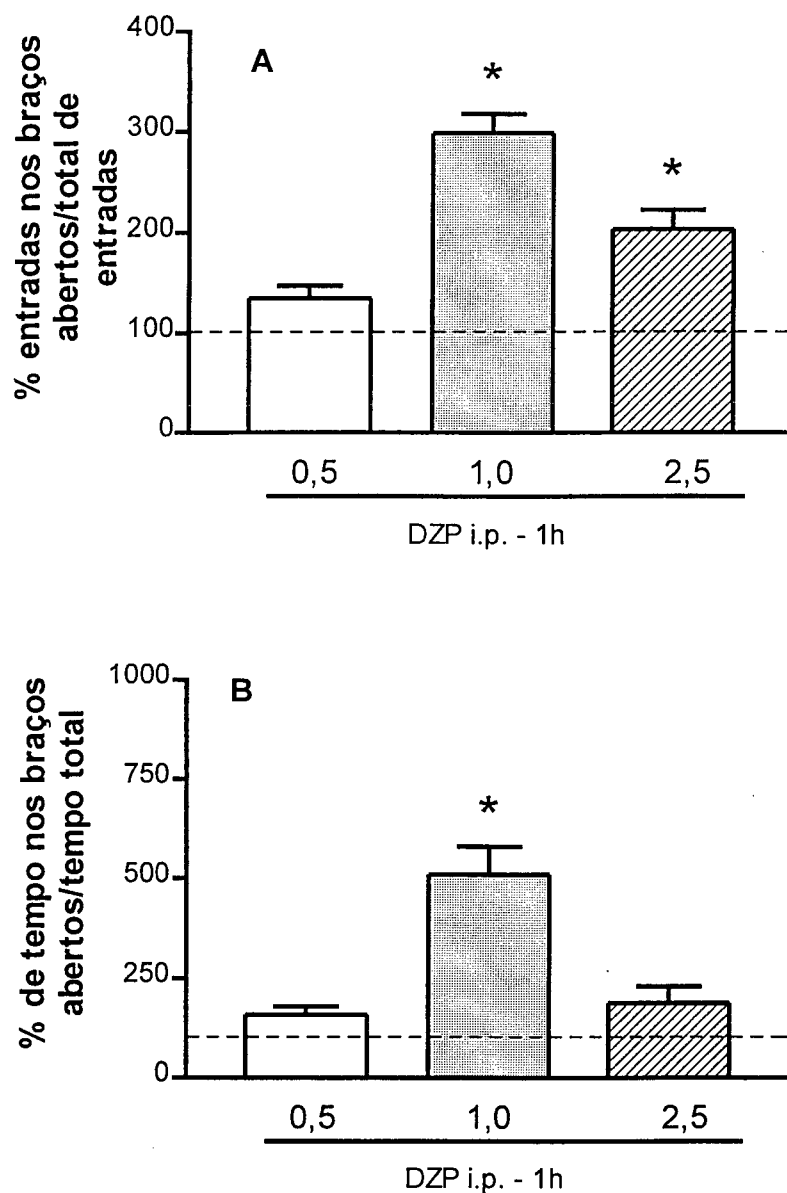


Figura 1 - Efeito da injeção de DZP 0,5 , 1,0 ou 2,5 mg/kg na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$) usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 9 e 12.

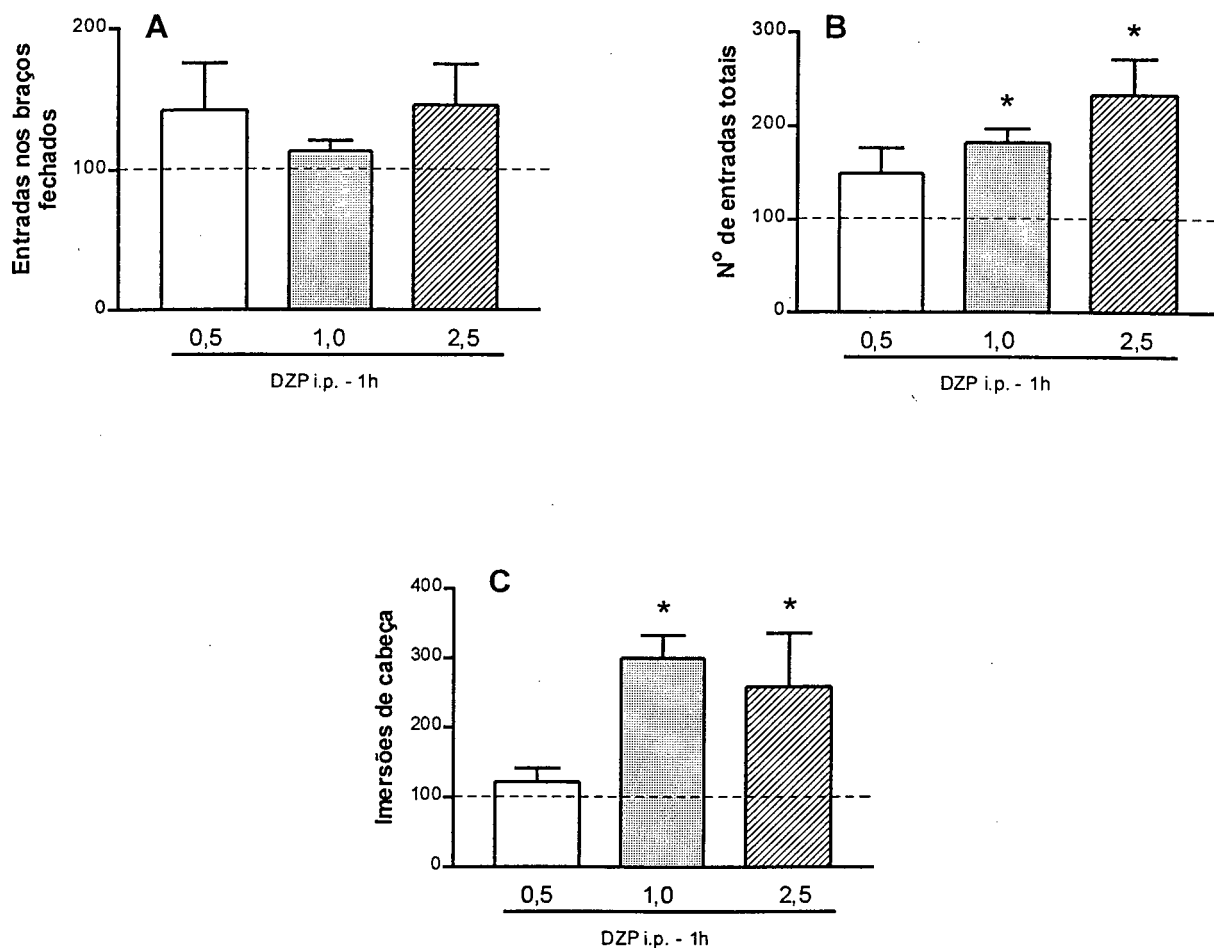


Figura 2 - Efeito da injeção i.p. de DZP 0,5 , 1,0 ou 2,5 mg/kg no número de entradas nos braços fechados (A), entradas totais (B) e imersões de cabeça (C), num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais empregados por tratamento variou entre 9 e 12.

Tabela 1 - Efeito do tratamento agudo i.p. com diazepam nas doses de 0,5, 1,0 e 2,5 mg/kg nos demais parâmetros comportamentais no LCE, durante 5 min. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais empregados por tratamento variou entre 9 e 12.

DZP mg/kg i.p.	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
0	14,1 \pm 1,7	8,8 \pm 1,4	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2
0,5	25,7 \pm 6,9	12,2 \pm 1,6	0,2 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0
2,5	5,5 \pm 1,5 *	12,2 \pm 2,0	1,2 \pm 0,2	0,5 \pm 0,5

DZP mg/kg i.p.	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
0	20,7 \pm 2,4	10,2 \pm 1,1	0,7 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2
1,0	9,7 \pm ,5 *	10,3 \pm 1,4	0,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,5

Efeito do tratamento agudo com o EA da *C. carthagenensis* no LCE**Objetivos:**

Investigar o efeito do tratamento oral agudo com o EA de *C. carthagenensis* no modelo do LCE.

Resultados:

A figura 3 mostra que a administração do EA da *C. carthagenensis* (v.o.), embora não tenha modificado significativamente a frequência de entradas nos braços abertos (A), aumentou de forma estatisticamente significativa o tempo de permanência dos animais nesses mesmos braços em relação ao tempo total (B) para as doses de 0,5 e 1,0 g/kg ($252,1 \pm 107,3\%$ e $223,9 \pm 32,4\%$ respectivamente). Na figura 4 estão os dados referentes ao número de entradas nos braços fechados (A), número de entradas totais (B) e o número de imersões de cabeça (C). O mesmo tratamento aumentou significativamente ($p < 0,05$) o parâmetro imersão de cabeças para a dose de 1,0 mg/kg ($145,4 \pm 18,4\%$). Os demais parâmetros comportamentais observados são apresentados na Tabela 2, onde o tratamento com as doses de 0,25 e 1,0 g/kg, reduziu significativamente ($p < 0,05$) o número de estiramentos ($56,6 \pm 12,2$ e $21,6 \pm 3,4$, respectivamente).

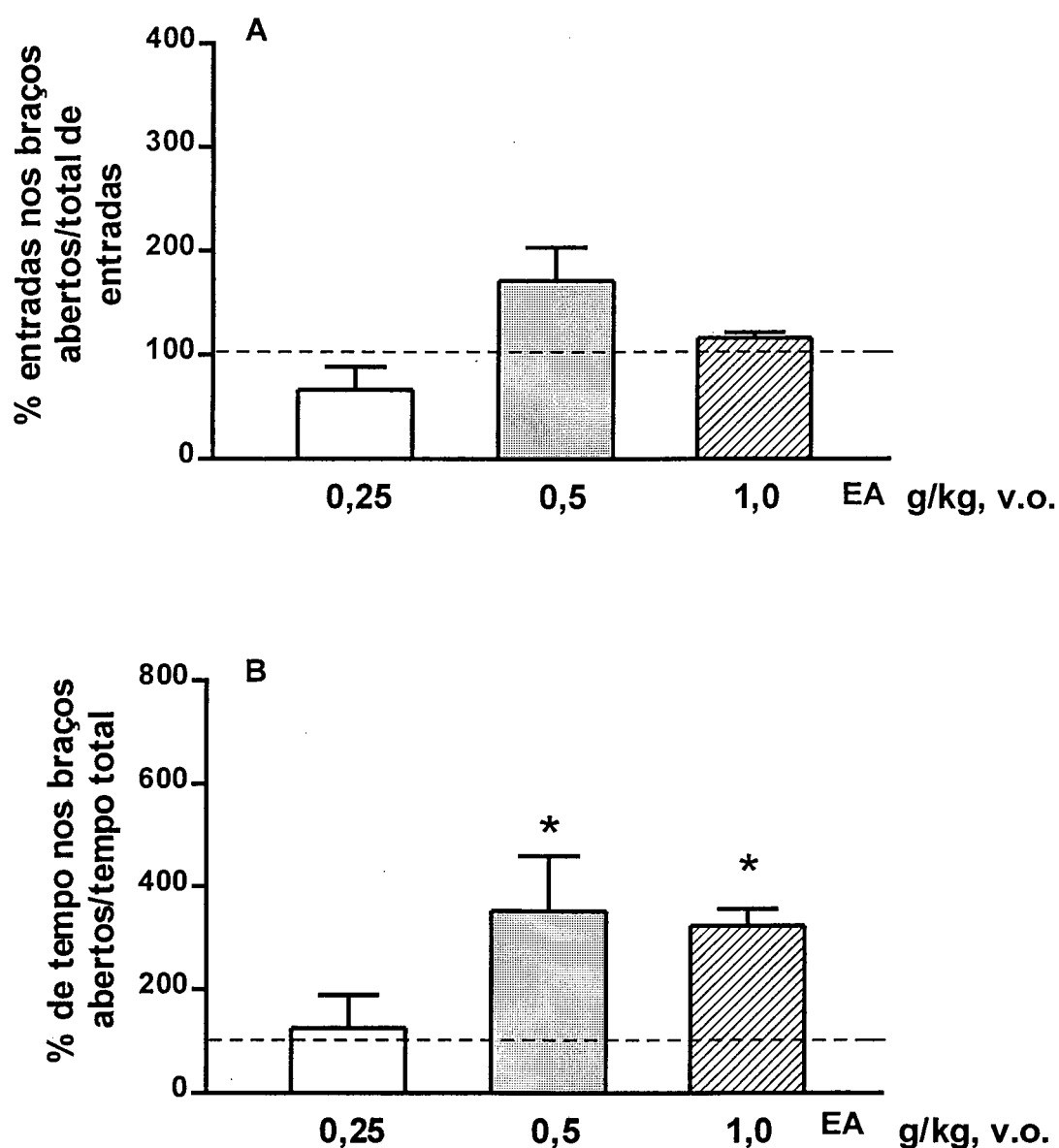


Figura 3 - Efeito da administração v.o. do EA da *C. carthagenensis* 0,25 , 0,5 ou 1,0 g/kg na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, observados por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média), e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), empregando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 9 e 12.

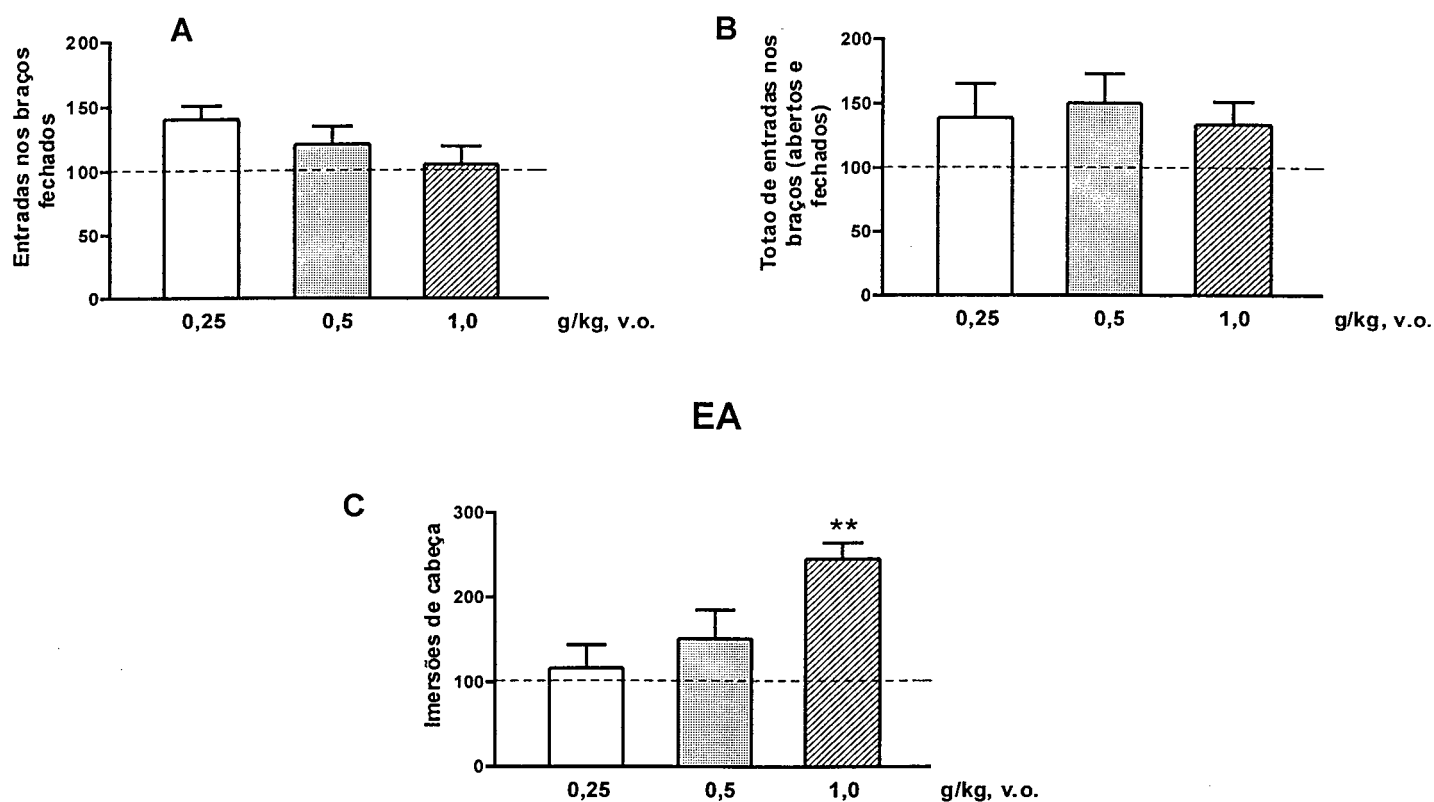


Figura 4 - Efeito da administração v.o. do EA da *C. carthagenensis* 0,25 , 0,5 ou 1,0 g/kg no número de entradas nos braços fechados (A), entradas totais (B) e imersões de cabeça (C), num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 9 e 12.

Tabela 2 - Efeito do tratamento agudo v.o. com o EA nas doses de 0,25 e 1,0 g/kg nos demais parâmetros observados no LCE. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais empregados por tratamento variou entre 9 e 12.

EA g/kg v.o.	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
0	20,3 \pm 3,4	5,2 \pm 1,1	1,0 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3
0,25	11,5 \pm 2,5 *	7,5 \pm 1,8	0,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,5
1,0	4,4 \pm 0,8 *	7,4 \pm 1,6	0,6 \pm 0,4	2,4 \pm 1,3

Efeito da administração repetida do EA da *C. carthagenensis***Objetivos:**

Verificar se o efeito do tipo ansiolítico do EA da *C. carthagenensis* observado com o tratamento oral agudo se mantinha com o tratamento repetido, sem desenvolver o fenômeno de tolerância.

Verificar o efeito do mesmo tratamento no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ), cujos tempos de flexão e extensão são reduzidos por drogas do tipo benzodiazepínicas.

Resultados:

A figura 5 mostra que a administração do EA da *C. carthagenensis* (14 dias *bid* v.o.) aumentou significativamente ($p<0,05$) a frequência de entradas nos braços abertos (A) nas doses de 0,25, 0,5 e 1,0 g/kg ($163,5\pm37,9$; $163,4\pm46,8$ e $182,8\pm49,5$, respectivamente) e aumentou de forma estatisticamente significativa ($p<0,05$) o tempo de permanência nesses mesmos braços em relação ao tempo total (B) nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg ($461,7\pm123,9$ e $583,9\pm153,6$, respectivamente) . Na figura 6 estão os dados referentes ao número de entradas nos braços fechados (A), entradas totais (B) e imersões de cabeça (C). O mesmo tratamento aumentou significativamente ($p<0,05$) os parâmetros de imersões de cabeça ($128,8\pm50,6$ e $206,8\pm79,5$) e entradas totais ($100\pm24,3$ e $191,3\pm32,6$), respectivamente para as doses de 0,5 e 1,0 g/kg, não alterando o número de entradas nos braços fechados. Os demais parâmetros comportamentais observados são apresentados na Tabela 3-A e não foram alterados pelo tratamento.

Na Tabela 3-B, observa-se que mesmo tratamento não alterou significativamente ($p>0.05$) os parâmetros do teste de convulsões por PTZ, sendo que nem mesmo o diazepam utilizado em doses crescentes de 1,0 a 1,5 alterou tais parâmetros.

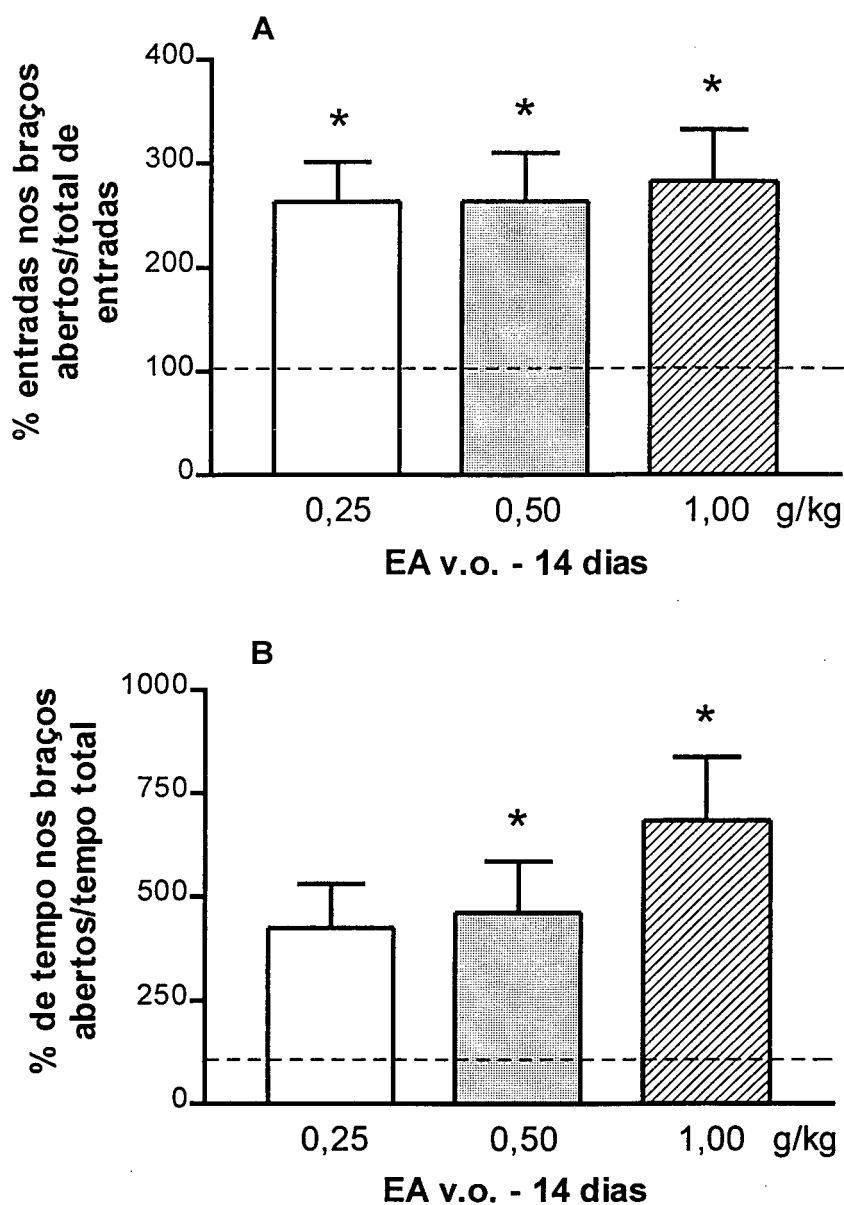


Figura 5 - Efeito da administração do EA da *C. carthagenensis* 0,25 , 0,5 ou 1,0 g/kg (14 dias *bid* v.o.) na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 8 e 10.

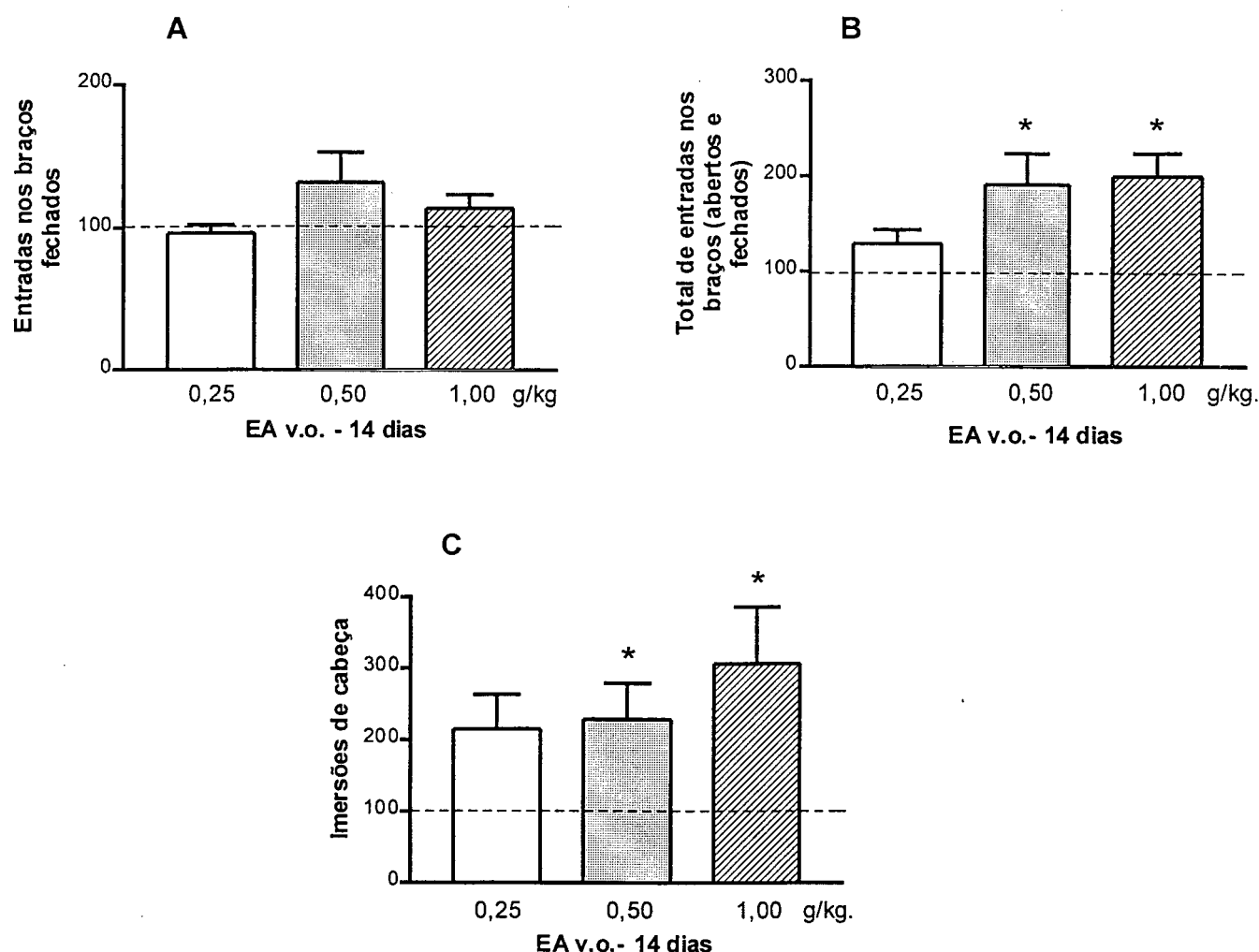


Figura 6 - Efeito da administração do EA da *C. carthagenensis* 0,25 , 0,5 ou 1,0 g/kg (14 dias *bid* v.o.) no número de entradas nos braços fechados (A), entradas totais (B) e imersões de cabeça (C), num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 8 e 10.

Tabela 3 - Efeito do tratamento repetido (14 dias v.o. *BID*) com o EA nas doses de 0,25 e 1,0 g/Kg nos demais parâmetros observados no LCE e no teste de convulsões induzidas por PTZ. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média, usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 8 e 10.

A – Labirinto em cruz elevado

EA g/kg v.o.	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECALIS
0	10,5 \pm 1,8	13,6 \pm 1,5	1,1 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3
0,25	10,3 \pm 1,4	12,4 \pm 1,2	2,8 \pm 0,7	0,8 \pm 0,4
1,0	8,9 \pm 1,7	8,4 \pm 1,5	3,4 \pm 1,1	0,8 \pm 0,6

B - Convulsões por pentilenotetrazol

TRATAMENTO	LATÊNCIA	DURAÇÃO
ÁGUA	$284,4 \pm 33,7$	$17,2 \pm 2,1$
EA / 0,25	$179,2 \pm 53,5$	$18,4 \pm 2,9$
EA / 1,0	$221,4 \pm 43$	$19,6 \pm 3,2$
DZP 1,0 a 1,5 mg/kg	$193,4 \pm 46,8$	$15,6 \pm 1,7$

Influência da mecamilamina no efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo tratamento agudo oral com o EA da *C. carthagenensis*

Objetivos:

Após verificado o efeito da administração aguda oral do EA da *C. carthagenensis* no LCE foi utilizada a mecamilamina (20 min. 15 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.), um antagonista de receptores nicotínicos, como pré-tratamento na tentativa de investigar a participação do sistema colinérgico neste efeito.

Resultados:

A figura 7 mostra que a administração do EA da *C. carthagenensis* (1,0 g/kg), quando seguida da administração da mecamilamina (15 $\mu\text{mol/kg}$ i.p.), levou a uma reversão do efeito do tipo ansiolítico do EA, para o parâmetro tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total (B). Na figura 8 estão os dados referentes ao número de entradas nos braços fechados (A) onde a administração da mecamilamina, após o tratamento com o EA reduziu significativamente este parâmetro e, conseqüentemente, reduziu o número de entradas totais (B), além de reduzir o número de imersões de cabeça (C) e reverter o efeito do EA em reduzir significativamente ($p < 0,05$) o número de estiramentos (D). Os demais parâmetros comportamentais observados são apresentados na Tabela 4 e não foram alterados significativamente ($p < 0,05$) pelo tratamento.

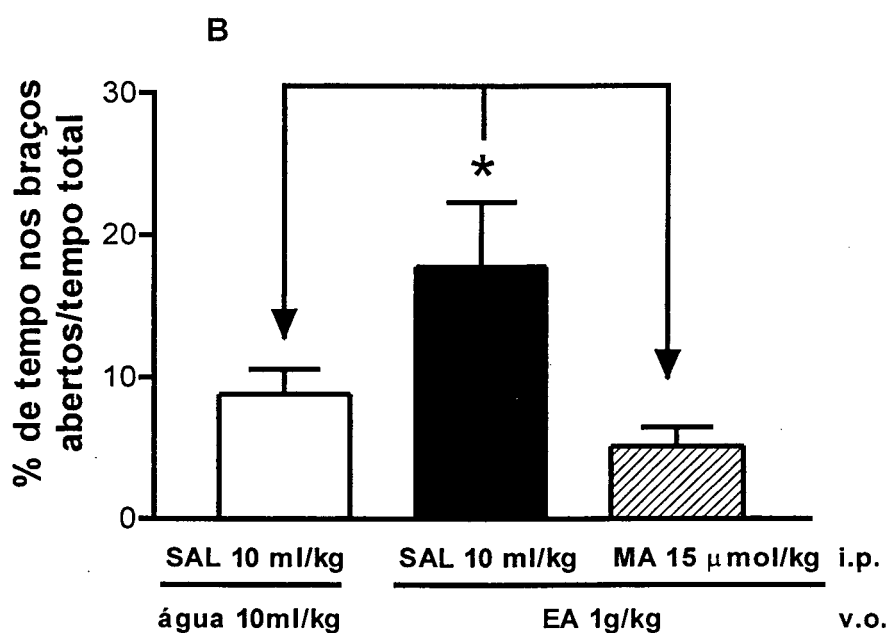
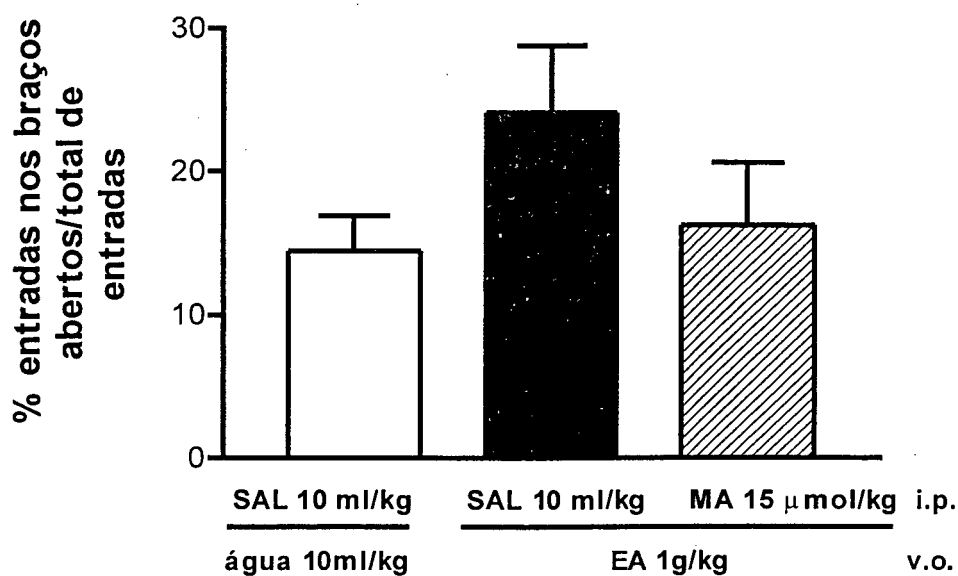


Figura 7 - Efeito do tratamento agudo do EA da *C. carthagenensis* (1,0 g/kg v.o.) seguido da administração de mecamilamina (20 min. 15 µmol/kg i.p.) na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 8 e 9.

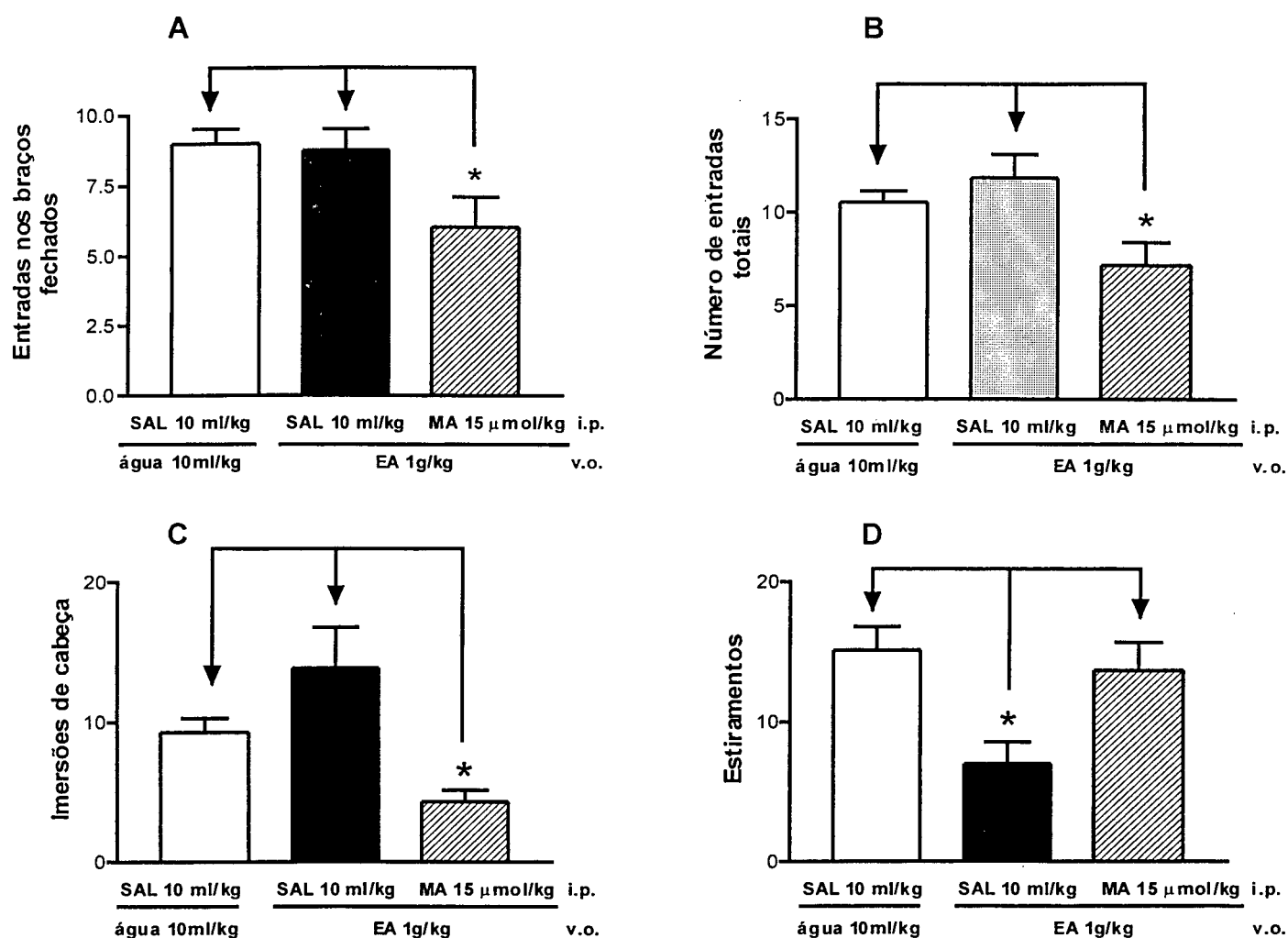


Figura 8 - Efeito do tratamento agudo do EA da *C. carthagenensis* (1,0 g/kg v.o., 1h) seguido da administração de mecamilamina (20 min. 15 µmol/kg i.p.) no número de entradas nos braços fechados (A), estiramentos (B) e imersões de cabeça (C), num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média), e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), empregando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais empregados por tratamento variou entre 8 e 9.

Tabela 4 - Efeito do EA da *C. carthagenensis* após o pré-tratamento com a mecamilamina, antagonista nicotínico. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 8 e 9.

TRATAMENTO	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
SAL + ÁGUA	10,9 \pm 1,2	0,8 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2
SAL + EA	13,7 \pm 2,8	1,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,7
MA + EA	8,4 \pm 1,4	1,0 \pm 0,3	0,0 \pm 0,0

Efeito da mecamilamina na atividade locomotora e na performance motora nos testes de campo aberto (arena de atividade) e rota-rod

Objetivos:

Como observado no LCE, a mecamilamina, antagonista nicotínico, administrada após o tratamento com o EA da *C. carthagenensis* promoveu uma redução no número de entradas nos braços fechados do LCE, indicativo de um efeito do tipo ansiogênico ou simplesmente conseqüente a uma diminuição de atividade locomotora. Desse modo, a mecamilamina foi utilizada na mesma dose que no LCE (15 µmol/kg) para investigarmos seu efeito no campo aberto e no rota-rod na tentativa de dissociar efeitos locomotores de um possível efeito do tipo ansiogênico.

Resultados:

A figura 9 mostra que a administração aguda (45 min) da mecamilamina (15 µmol/kg), não produziu alteração significativa ($p>0,05$) na atividade locomotora avaliada no campo aberto por 5 min, pois o único parâmetro que se mostrou significativamente alterado foi o número de bolos fecais. Na figura 10 estão os dados referentes ao teste de coordenação motora dos animais submetidos ao mesmo tratamento com a mecamilamina, onde não se observa qualquer prejuízo motor nos parâmetros registrados no rota-rod.

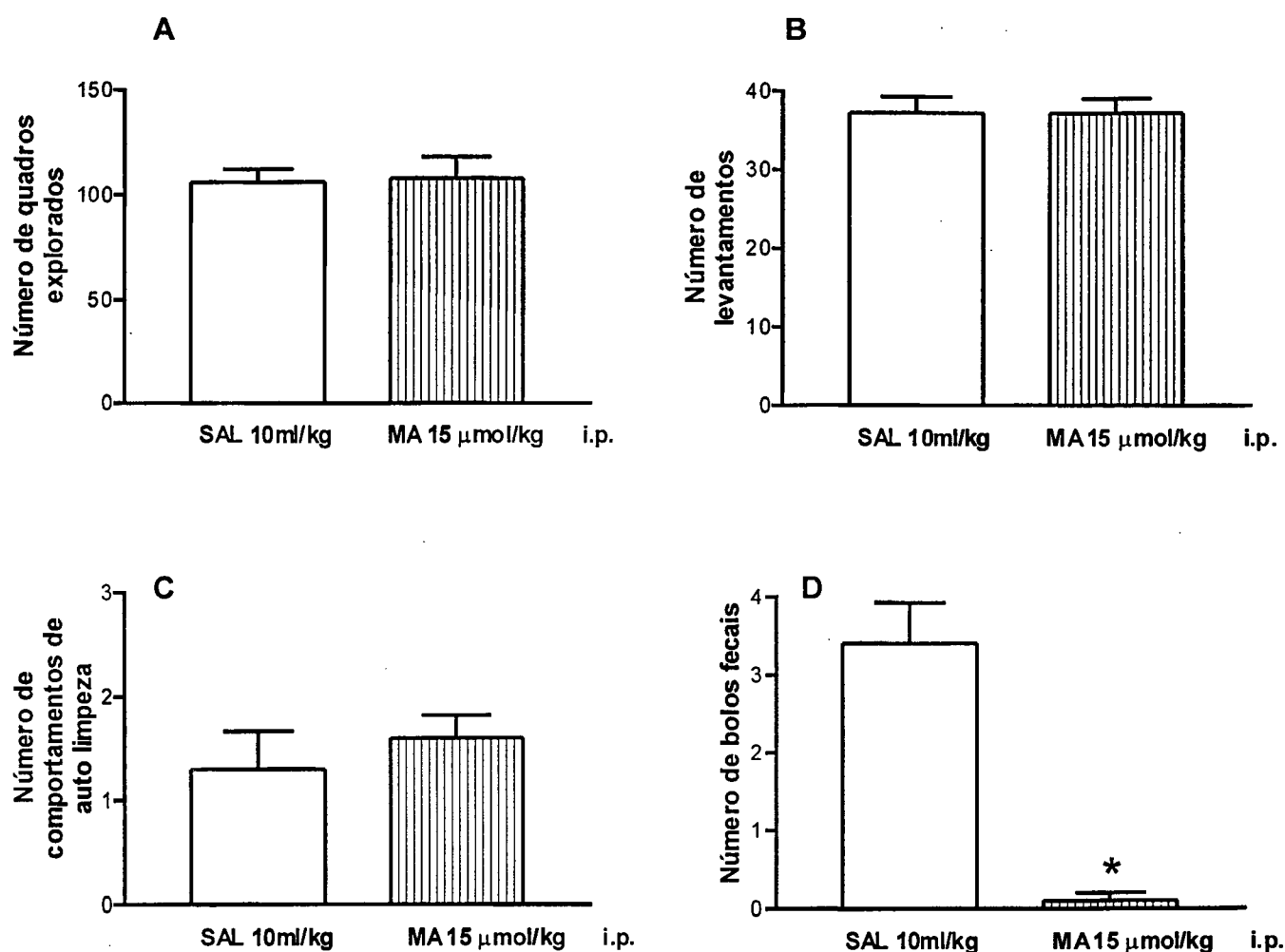


Figura 9 - Efeito da administração aguda de mecamilamina (20 min. 15 μ mol/kg i.p.) num período de 5 min., no campo aberto. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle, usando-se o teste *t* de Student não pareado. O número de animais empregados por tratamento foi de 10.

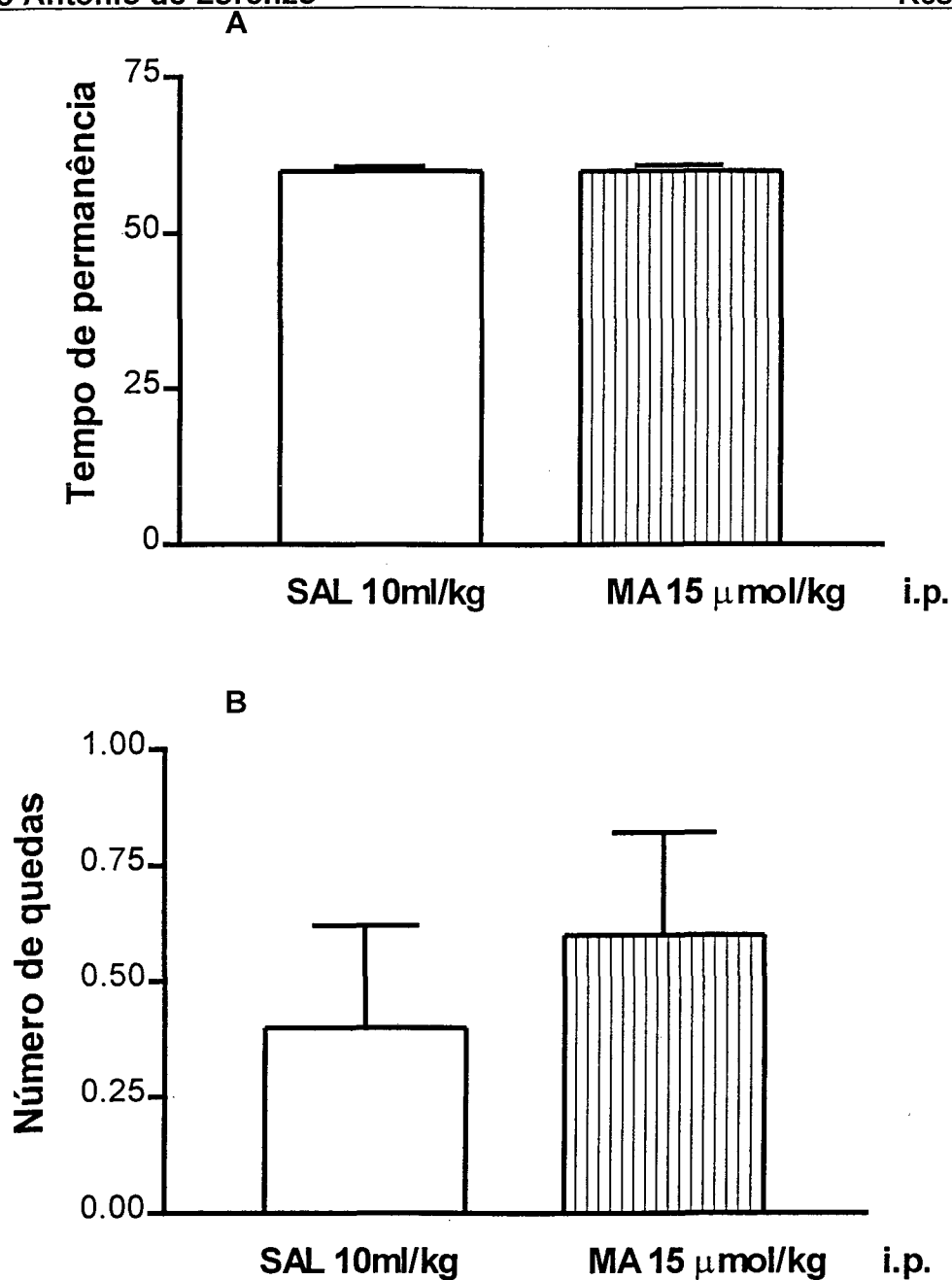


Figura 10 - Efeito da administração aguda de mecamilamina (20 min 15 µmol/kg i.p.) num período de 1 min no rota-rod. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média), usando-se o teste *t* de Student não pareado. O número de animais empregados por tratamento foi de 10.

Avaliação do tratamento com mecamilamina no labirinto em cruz elevado.**Objetivos:**

Neste experimento foi avaliado o resultado do tratamento dos animais unicamente com a mecamilamina, um antagonista de receptores nicotínicos, para que se pudesse observar se este antagonista poderia causar, isoladamente alguma alteração nos parâmetros do LCE.

Resultados:

A figura 11 mostra que a administração de mecamilamina não alterou significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros número e tempo de entradas nos braços abertos do LCE. Na figura 12, observa-se que o mesmo tratamento não alterou significativamente ($p < 0,05$) os parâmetros número de entradas nos braços fechados, número de imersões de cabeça e número de estiramentos.

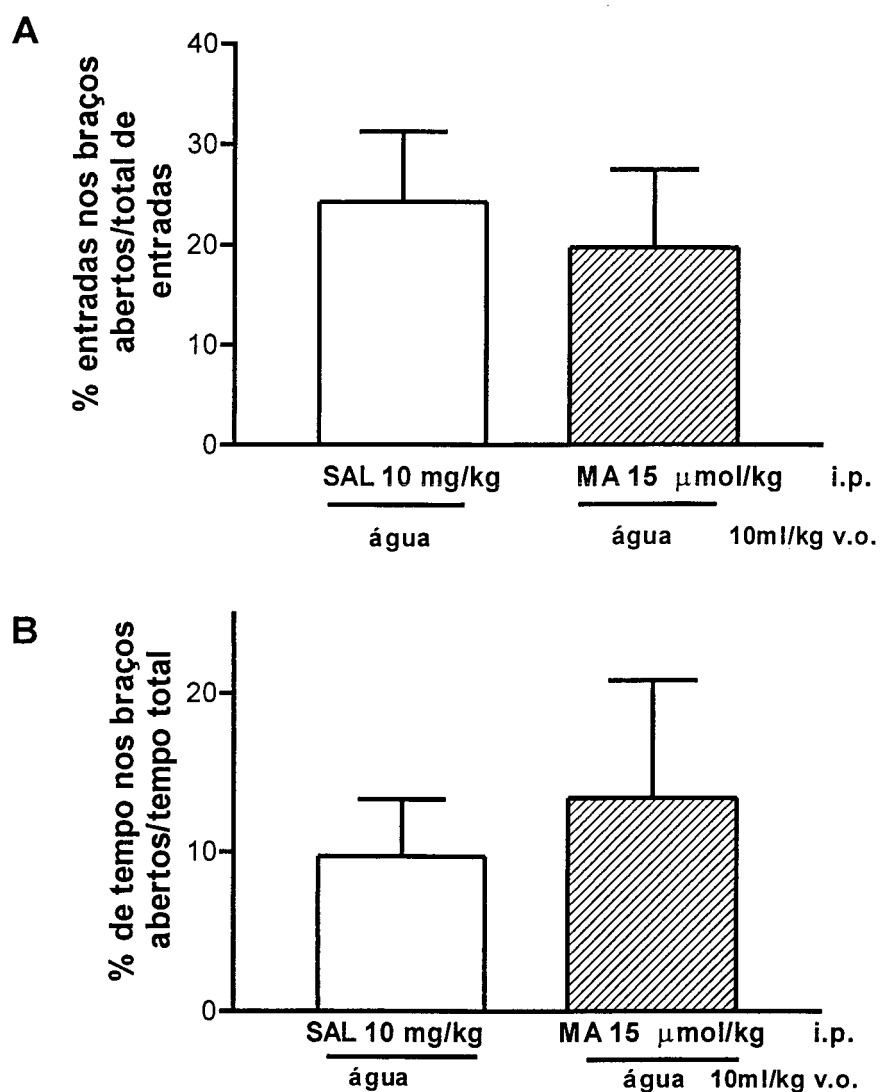


Figura 11 - Efeito do tratamento com mecamilamina (20 min. 15 µmol/kg i.p.) na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) , usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 8 e 10.

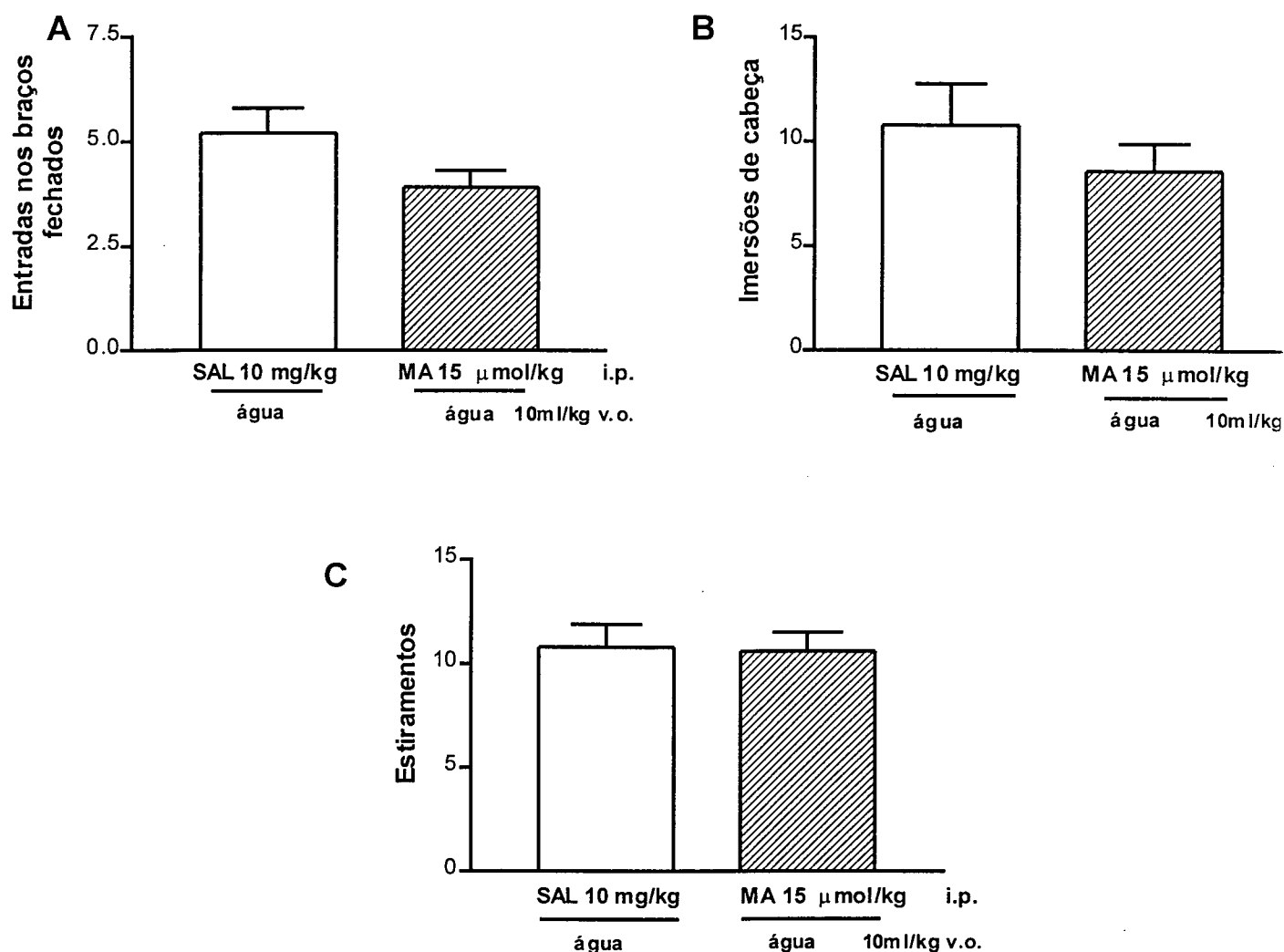


Figura 12 - Efeito do tratamento com mecamilamina (20 min. 15 μ mol/kg i.p.) no número de entradas nos braços fechados (A), imersões de cabeça (B) e estiramientos (C), num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média), empregando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais empregados por tratamento variou entre 8 e 10.

Influência da metilcaconitina no efeito do tipo ansiolítico do tratamento agudo oral com o EA da *C. carthagenensis*

Objetivos:

Após verificar o efeito do tipo ansiolítico da administração oral aguda do EA da *C. carthagenensis* no LCE, foi utilizada a metilcaconitina, um antagonista nicotínico neuronal, para confirmar a participação do sistema colinérgico neste efeito.

Resultados:

A figura 13 mostra que a administração prévia do veículo (PBS 2 μ L, i.c.v.) ou da metilcaconitina (30 nmol/2 μ L, i.c.v.) à administração oral aguda (1 h) do EA da *C. carthagenensis* (1,0 g/kg) bloqueou o efeito do tipo ansiolítico do EA até então observado no parâmetro número de entradas nos braços abertos (A) e/ou tempo de permanência nos braços abertos em relação ao tempo total (B). Na figura 14 estão os dados referentes ao número de entradas nos braços fechados (A), imersões de cabeça (B), e o de estiramentos (C), onde a metilcaconitina foi capaz de reverter a redução significativa ($p < 0,05$) desse parâmetro promovida pelo EA. Os demais parâmetros comportamentais observados estão apresentados na Tabela 5 e não foram alterados significativamente ($p > 0,05$).

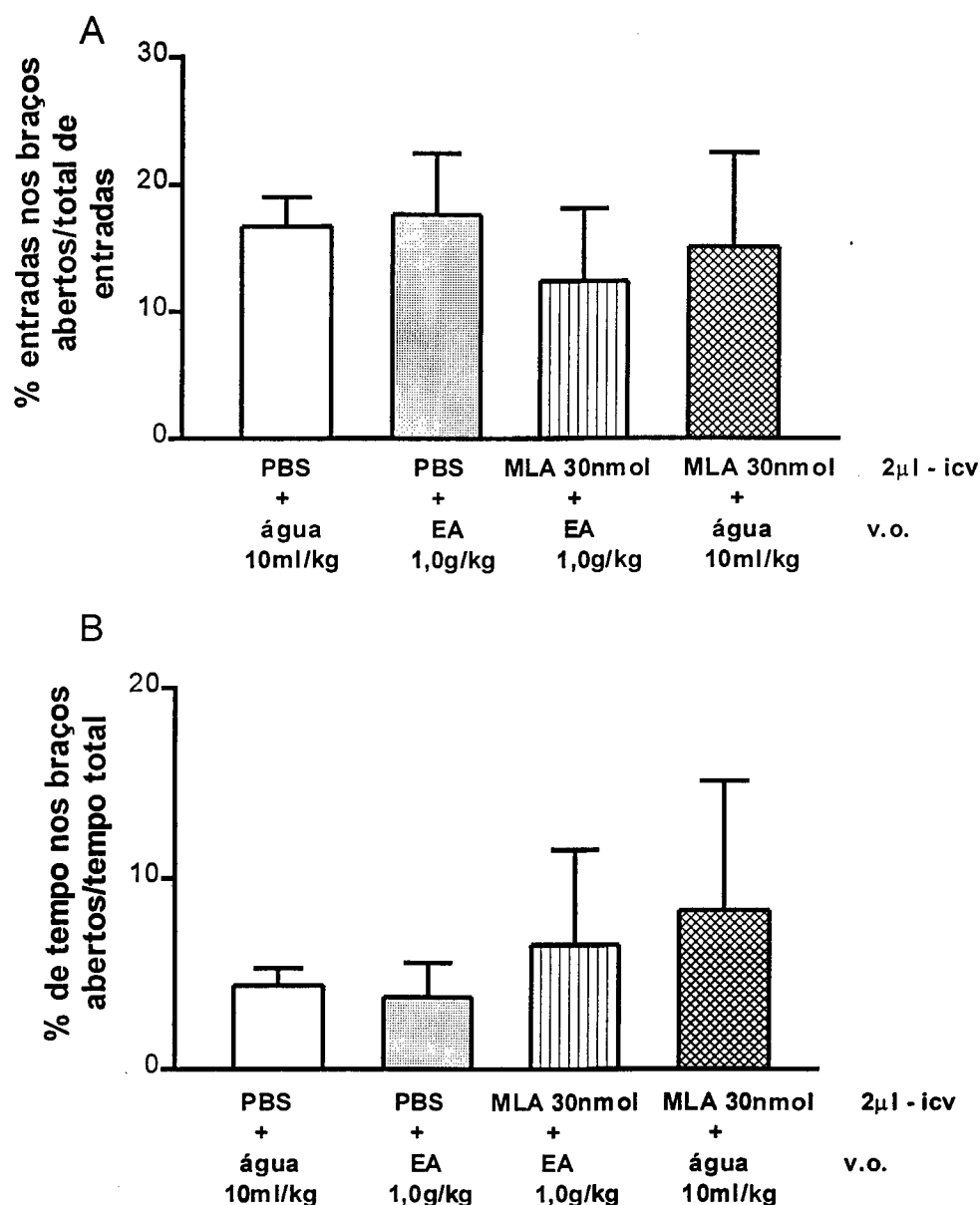


Figura 13 - Efeito do tratamento agudo do EA da *C. carthagenensis* (1 h 1,0 g/kg v.o.) após a administração de metilcaconitina (30 nmol/2μl i.c.v.) na frequência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação aos valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 7 e 8.

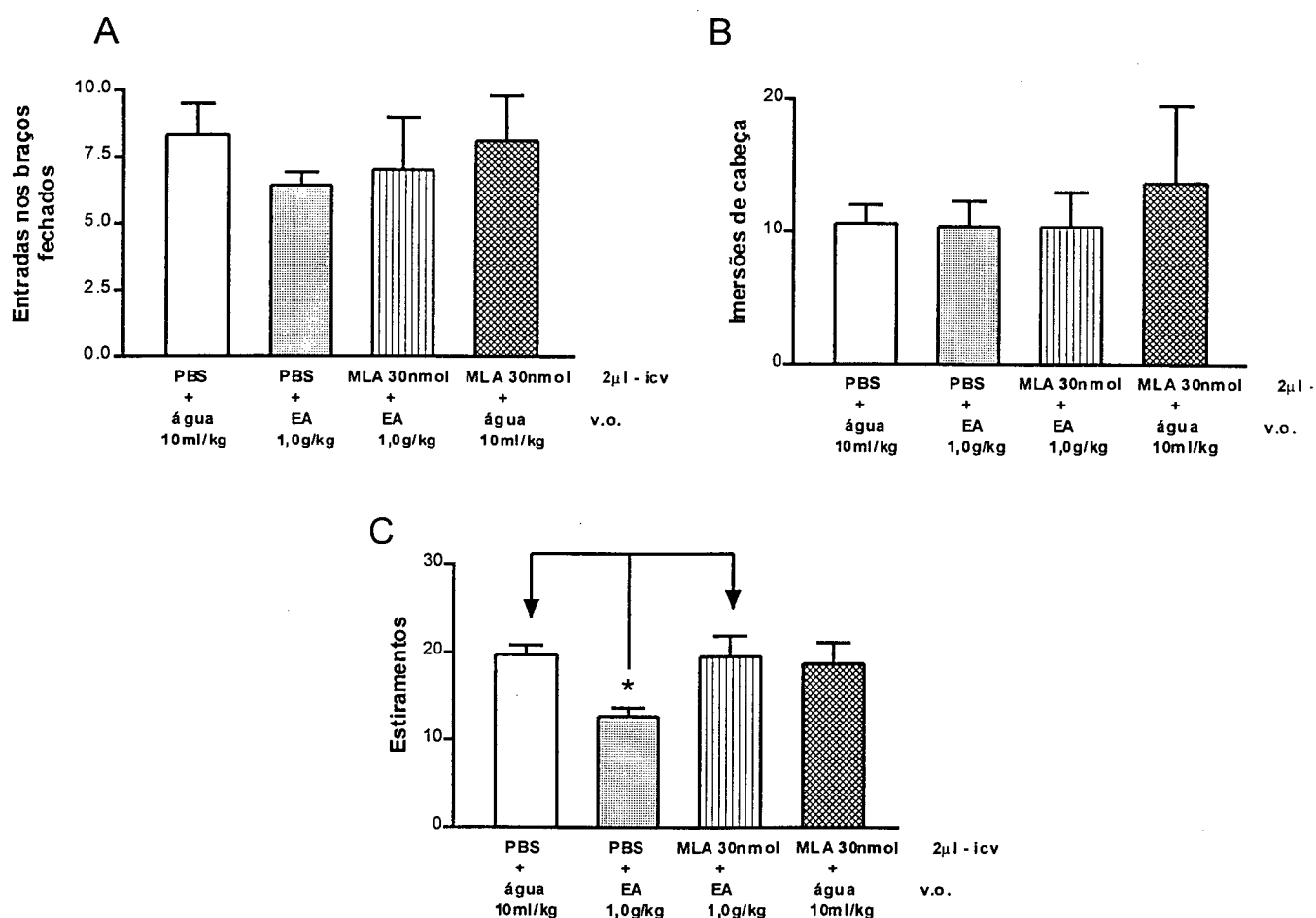


Figura 14 - Efeito do tratamento agudo do EA da *C. carthagenensis* (1,0 g/kg v.o., 1 h) em seguida à administração de metilcaconitina (30 nmol/2 μ L i.c.v.) no número de entradas nos braços fechados (A), estiramientos (B) e imersões de cabeça (C), num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 7 e 8.

Tabela 5 - Efeito do tratamento oral agudo (1h) com o EA da *C. carthagenensis* (1 g/kg) após a administração de metilcaconitina (30 nmol/2 μ L i.c.v.) nos demais parâmetros do LCE. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 7 e 8.

TRATAMENTO	LEVENTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
PBS + ÁGUA	14,1 \pm 1,4	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,7
PBS + EA	11,1 \pm 1,1	0,6 \pm 0,2	1,7 \pm 1,0
MLA + EA	10,7 \pm 2,7	0,9 \pm 0,3	1,1 \pm 0,5
MLA + ÁGUA	11,4 \pm 0,8	1,1 \pm 0,4	0,6 \pm 0,6

Efeito da administração oral aguda da fração semi-purificada PPT-3 de *C. carthagenensis* no LCE

Objetivos:

Verificar se o efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo tratamento agudo e repetido com o EA da *C. carthagenensis* v.o. se conservava na fração semi-purificada PPT-3 (0,1 ; 0,25 ; 0,5 g/kg), guardando uma relação de doses, que indicaria se o processo de semi-purificação concentrou as substâncias ativas responsáveis por este efeito.

Verificar se o mesmo tratamento produzia algum efeito nos testes do sono barbitúrico e convulsões induzidas por pentilenotetrazol ou eletrochoque transcorneal máximo.

Resultados:

A figura 15 mostra que a administração oral aguda (1H) do PPT-3 da *C. carthagenensis* aumentou significativamente ($P < 0,05$) a frequência de entradas nos braços abertos (A) na dose de 0,25 g/kg e o tempo de permanência nesses mesmos braços em relação ao tempo total (B) ($30,6 \pm 8,8$ e $48,8 \pm 12,51$). Na figura 16 estão os dados referentes ao número de entradas nos braços fechados (A), entradas totais (B) e imersões de cabeça (C) que não foram alterados pelo tratamento. Os demais parâmetros comportamentais observados são apresentados na Tabela 6, onde observa-se que o PPT-3 nas doses de 0,25 e 0,5 foi capaz de aumentar e diminuir, respectivamente, de maneira significativa ($p < 0,05$) o número de estiramentos.

Os resultados mostrados nas tabelas de 7 a 9 mostram que o tratamento com o PPT-3 não alterou significativamente ($p>0,05$) nenhum parâmetro dos três testes realizados. O DZP (2,5 mg/kg i.p.) reduziu e aumentou significativamente ($p<0,05$) a latência e duração, respectivamente, no teste do sono barbitúrico. Nessa mesma dose o DZP reduziu de maneira significativa ($p<0,05$) o tempo de extensão no teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo. No teste de convulsões induzidas por PTZ, o DZP (1,0 mg/kg i.p) aumentou a latência e reduziu a duração das convulsões de maneira significativa ($p<0,05$).

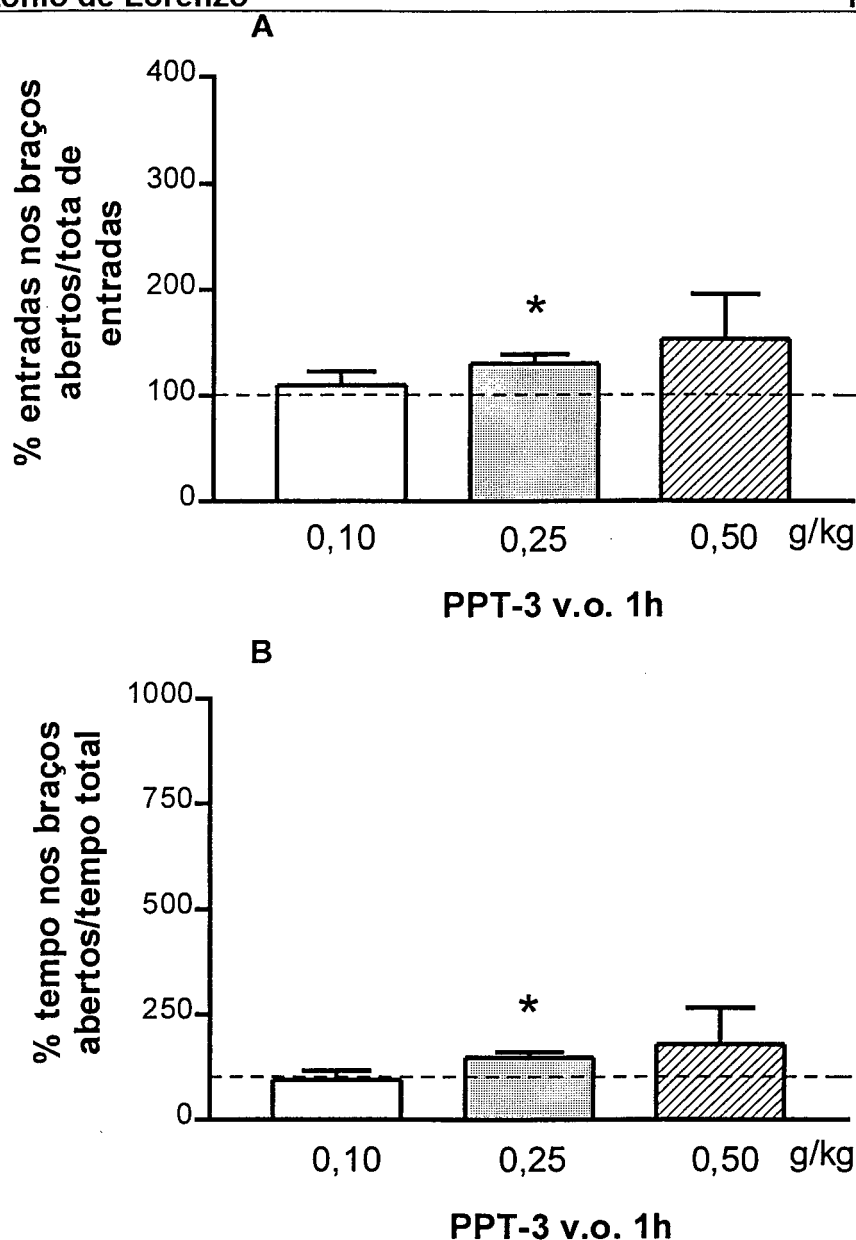


Figura 15 - Efeito da administração aguda do PPT-3 da *C. carthagenensis* 0,1 , 0,25 ou 0,5 g/kg (1 h, v.o.) na freqüência de entradas (A) e no tempo de permanência (B) nos braços abertos do LCE, num período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 5 e 12.

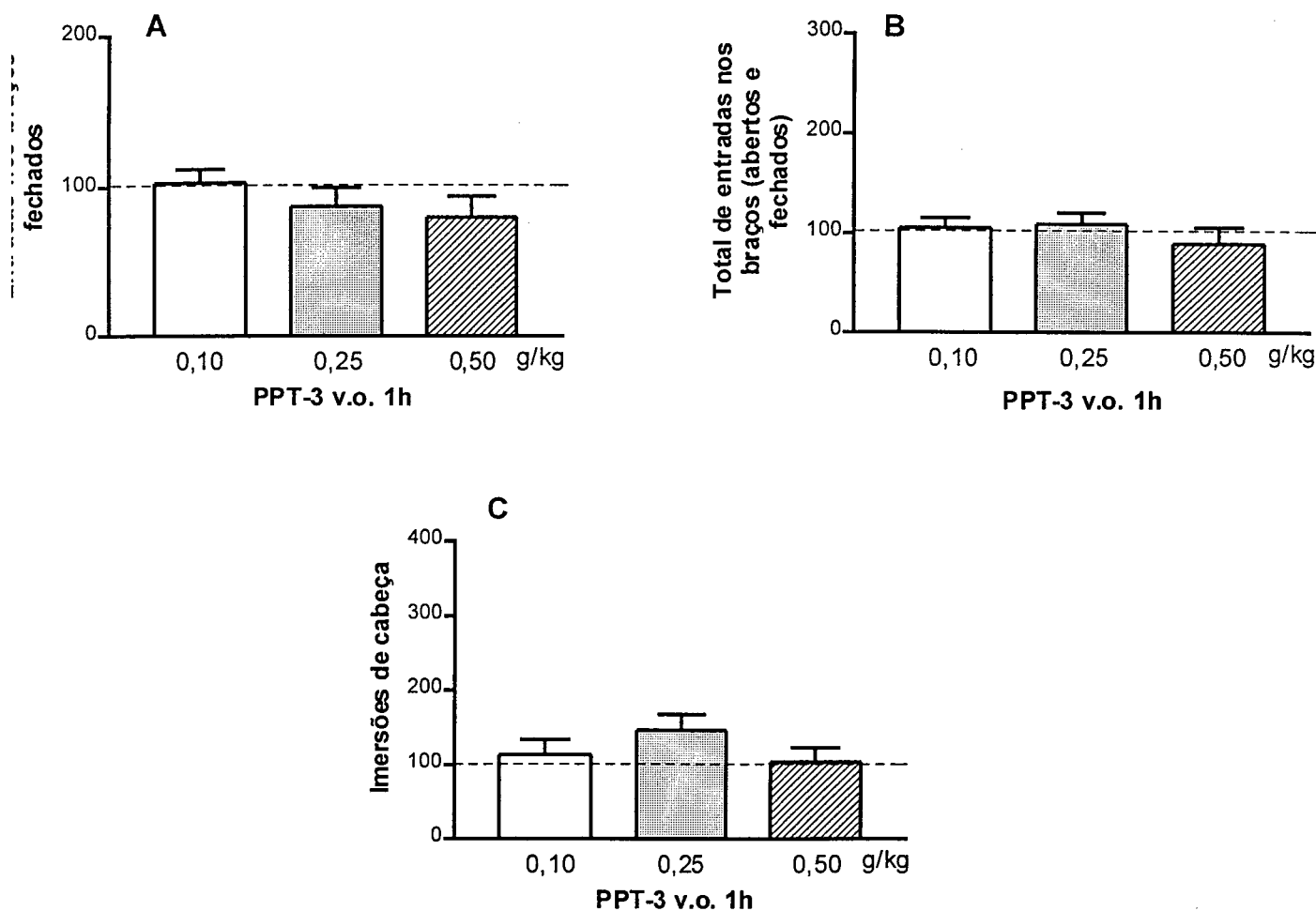


Figura 16 - Efeito da administração aguda do PPT-3 da *C. carthagenensis* 0,1 , 0,25 ou 0,5 g/kg (1 h, v.o.) no número de entradas nos braços fechados (A), entradas totais (B) e imersões de cabeça (C), observados por um período de 5 min. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos, as barras verticais os EPM (erro-padrão da média) e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 5 e 12.

Tabela 6 - Efeito do tratamento agudo v.o. com PPT-3 nas doses de 0,10; 0,25 e 0,50 g/kg nos demais parâmetros observados no LCE. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 5 e 12.

PPT-3 g/kg v.o.	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
0	14,1 \pm 1,7	8,8 \pm 1,4	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2
0.10	18,1 \pm 2,6	13,1 \pm 1,6	0,7 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2

PPT-3 mg/kg v.o.	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
0	5,7 \pm 1,0	6,8 \pm 1,0	0,8 \pm 0,1	0,3 \pm 0,3
0.25	12 \pm 1,4 *	5,3 \pm 1,0	1,1 \pm 0,4	0,4 \pm 0,3

PPT-3 mg/kg v.o.	SAP	LEVANTAR	AUTO-LIMPEZA	BOLOS FECAIS
0	20,6 \pm 2,4	10,2 \pm 1,1	0,7 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2
0.50	9,5 \pm 1,4 *	7,5 \pm 1,0	1,3 \pm 0,3	0,9 \pm 0,4

Tabela 7: Efeito do tratamento agudo v.o. com PPT-3 nas doses de 0,10, e 0,50 g/Kg no teste do sono Induzido por barbitúrico (pentobarbital sódico 50 mg/kg i.p.). A latência está registrada em segundos e a duração em minutos. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 5 e 9.

PPT-3 g/kg v.o.	LATÊNCIA	DURAÇÃO
0	294,1 \pm 23,6	107,1 \pm 9,0
0,10	284,6 \pm 43,8	94,9 \pm 10,7
DZP 2,5mg/kg i.p.	175,7 \pm 17,0 *	166,9 \pm 9,1 *

PPT-3 g/kg v.o.	LATÊNCIA	DURAÇÃO
ÁGUA	254,6 \pm 11,8	52,1 \pm 10,6
0,5	285,4 \pm 65,7	60,9 \pm 15,1
DZP 1,0 mg/kg i.p.	205,7 \pm 13,3	65,4 \pm 5,7

Tabela 8: Efeito do tratamento agudo v.o. com PPT-3 nas doses de 0,10, 0,25 e 0,50 g/Kg no teste de convulsões induzidas por eletrochoque transcorneal máximo. Os tempo de flexão e extensão estão registrados em segundos. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 5 e 9.

PPT-3 g/kg v.o.	FLEXÃO	EXTENSÃO
0	1,6 \pm 0,2	14,9 \pm 0,4
0,1	1,5 \pm 0,1	14,9 \pm 0,5
DZP 2,5mg/kg i.p.	2,1 \pm 0,3	11,6 \pm 1,0 *

PPT-3 g/kg v.o.	FLEXÃO	EXTENSÃO
0	1,9 \pm 0,1	14,5 \pm 0,6
0,25	1,9 \pm 0,2	16 \pm 0,7
0,5	2,1 \pm 0,3	15,1 \pm 1,1
DZP 1,0mg/kg i.p.	2,6 \pm 0,3	12,3 \pm 1,6

Tabela 9 - Efeito do tratamento agudo v.o. com PPT-3 nas doses de 0,10, 0,25 e 0,50 g/Kg e diazepam na dose de 1,0 mg/kg no teste de convulsões induzidas por pentilenotetrazol (80 mg/kg i.p.). Os tempos de flexão e extensão estão registrados em segundos. Os dados estão expressos como média \pm erro-padrão da média e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao valores obtidos nos grupos controle ($p < 0,05$), usando-se a análise da variância univariada seguida do teste de Dunnett. O número de animais por tratamento variou entre 7 e 8.

PPT-3 g/kg v.o.	LATÊNCIA	DURAÇÃO
0	335,1 \pm 60,7	17,5 \pm 2,0
0,1	260,7 \pm 68,3	24,1 \pm 4,6
0,25	191,5 \pm 29,7	19,7 \pm 3,3
0,5	231,3 \pm 39,3	17,6 \pm 2,0
DZP 1,0mg/kg i.p.	1098,6 \pm 266,1 *	5,4 \pm 2,1 *

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Na fase inicial de experimentos realizados no presente trabalho, foi caracterizado o efeito ansiolítico do diazepam (DZP), droga padrão, no labirinto em cruz elevado (LCE) para validação da metodologia usada na avaliação da atividade central da *C. carthagenensis*. Foi escolhida a dose de 1,0 mg/kg, por via intraperitoneal, como a dose efetiva ansiolítica que serviu para fins comparativos, nesse modelo. A injeção i.p. de DZP aumentou significativamente a frequência e o tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Os resultados obtidos com o DZP no LCE são freqüentemente encontrados com drogas ansiolíticas benzodiazepínicas e outros compostos cujo mecanismo de ação envolve o sistema GABAérgico, que reduzem a ansiedade, o conflito e a avaliação de risco, além de estimularem o comportamento exploratório (Dalvi e Rodgers, 1996).

Quando agonistas benzodiazepínicos, como o diazepam, se acoplam aos seus sítios de ligação presentes no receptor GABA_A, há uma modificação alostérica no sítio de ligação do GABA, facilitando seu acoplamento com o receptor. Isso promove um influxo de íons Cl⁻ para o interior da célula, tornando a membrana pós-sináptica hiperpolarizada, ou seja, mais negativa no seu interior, o que diminui a probabilidade de que o limiar para um potencial de ação seja atingido no neurônio pós sináptico (DeLory e Olsen, 1994).

Os efeitos farmacológicos dos benzodiazepínicos vão desde a ação ansiolítica até a propriedade hipnótica, em caso de doses mais elevadas, sendo o tratamento da insônia uma de suas indicações terapêuticas primárias. Outros

efeitos dos benzodiazepínicos incluem o relaxamento parcial da musculatura esquelética, que destina-se ao tratamento de espasmos musculares, e uma ação anticonvulsivante, sendo usados na terapia e profilaxia de epilepsias. Os efeitos colaterais existentes são incoordenação motora e perturbação da marcha (ataxia), entre outros. Doses mais elevadas podem causar amnésia anterógrada, onde o paciente esquece muitos fatos ocorridos após tomar a droga. Os benzodiazepínicos também acentuam os efeitos do álcool e de outros depressores sobre o SNC quando administrados concomitantemente com estes, facilitando assim acidentes de trânsito e aumentando consideravelmente o risco de intoxicação por estes agentes (Graeff, 1996).

Após a obtenção desses resultados com o diazepam, os experimentos realizados com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento oral agudo com o EA da *C. carthagenensis*, no comportamento de camundongos no modelo do LCE, mostram que o EA exerceu, à semelhança do diazepam, um efeito do tipo ansiolítico aumentando significativamente a frequência e o tempo de permanência dos animais nos braços abertos do LCE.

Uma vez observada a atividade do tipo ansiolítica após o tratamento agudo com o EA da *C. carthagenensis*, verificamos se este efeito se mantinha com a mesma intensidade após o tratamento repetido (no caso por 14 dias), pois os benzodiazepínicos e seus similares levam ao desenvolvimento do fenômeno de tolerância com a repetição do tratamento, e conseqüente redução da resposta (Andreattini e Leite, 1994). Observamos que o tratamento repetido com o EA promoveu um efeito do tipo ansiolítico ainda mais evidente do que no tratamento agudo, não houve, portanto, o desenvolvimento do fenômeno de tolerância ao EA.

Estes resultados sugerem que o efeito do tipo ansiolítico apresentado pelo EA da *C. carthagenensis* deve envolver mecanismos distintos daquele afetados pelos benzodiazepínicos.

A avaliação preliminar da atividade central do EA (De Lima, 1998 ; Gavioli, 1998) sugere que esta planta não possui um perfil de ação semelhante aos benzodiazepínicos, pois, mesmo nas doses mais altas utilizadas, não potencializou o sono induzido por barbitúricos, não protegeu o SNC de convulsões induzidas por pentilenotetrazol ou eletrochoque transcorneal, além de não produzir prejuízos motores no “rota-rod” ou no teste da chaminé, o que seria esperado quando se trata de compostos com atividade tipo benzodiazepínicos. Esses testes comportamentais complementares são comumente utilizados para diferenciação de drogas e compostos que exercem efeito ansiolítico por atuarem ou não como benzodiazepínicos, o que se pode observar no estudo do honokiol, um composto do tipo ansiolítico extraído da *Magnolia bark* (Kuribara e col, 1999).

Além disso, trabalhos anteriores realizados com a *C. aperta* Koehne e com a *C. balsamona* Scham & Schuldt (Ericeira e col., 1984 ; Santos e col., 1986 ; Santos, 1987), desenvolvidos na UNIFESP/EPM, mostraram uma atividade colinomimética para as preparações estudadas. E, recentemente, estudos feitos com a *C. carthagenensis* mostraram que o EA e a fração semi purificada desta planta, PPT-3, apresentam substâncias capazes de reverter o bloqueio dos receptores nicotínicos musculares produzido por antagonistas do tipo competitivo, como a d-tubocurarina e a α -bungarotoxina, e do tipo despolarizantes como a succinilcolina (Viel, 1998). Essa ação não parece ser devida à presença de

flavonóides, como a quercetina, implicada na atividade antioxidante da *C. carthagenensis* (Schuldt, 1999)

Somando-se a essas evidências, informações da literatura acerca dos efeitos da nicotina em fumantes, não os deletérios, mas os possíveis efeitos benéficos que poderão vir a ser usados terapeuticamente (Nicotine and the brain, 1998), temos um importante papel da nicotina no SNC que deve ser repensado. A nicotina ativa uma série de mecanismos cerebrais ligando-se a receptores nicotínicos que encontram-se distribuídos em várias áreas do SNC, existindo diversas variações estruturais entre diferentes tipos de receptores nicotínicos, de acordo com a combinação de suas sub-unidades (Green e col., 1998). A nicotina pode exercer ações dramaticamente distintas, dependendo da localização e do subtipo de receptor ao qual se liga, sendo que atualmente estão sendo pesquisadas as funções de cada subtipo de receptores. Alguns autores tentam uma melhor compreensão dos efeitos da nicotina para explicar o porquê do freqüente aparecimento de outros distúrbios, tais como depressão ou esquizofrenia em indivíduos que tentam parar de fumar. Estes indivíduos, inconscientemente podem estar reequilibrando seus sistemas químicos tratando a si próprios com a nicotina, quando voltam a fumar a cada tentativa de abandonar o seu vício (Nicotine and the brain, 1998).

Mais recentemente aceita-se que a acetilcolina é um dos neurotransmissores relacionados à ansiedade. Graeff (1994) realizou alguns experimentos que indicam que a acetilcolina (Ach) facilita o comportamento defensivo no hipotálamo e na matéria cinzenta periaquedutal (MCP), fazendo pensar na existência de mecanismos colinérgicos que regulam o comportamento

de agressão defensiva. Os receptores centrais de Ach são de dois tipos: muscarínicos (RCM) e nicotínicos (RCN), divisão baseada na capacidade dos alcalóides naturais, muscarina e nicotina, respectivamente, de mimetizar os efeitos da Ach nestes sítios. Até recentemente, a pesquisa neuropsicofarmacológica focalizava principalmente os RCM, enquanto que os RCN eram estudados pelo seu papel na transmissão ganglionar e neuromuscular nos sistemas nervosos simpático e parassimpático. Entretanto, hoje sabe-se que a nicotina possui efeito ansiolítico, e sugere-se que esse efeito envolva uma ação no complexo GABA-BDZ. Uma diferença importante em relação aos ansiolíticos BDZs é que a nicotina não causa prejuízo da memória e de outras funções cognitivas. Ao contrário, pode melhorá-las. Por isso, algumas companhias farmacêuticas procuram agentes nicotínicos que possuam propriedades ansiolíticas e nootrópicas, porém que, ao contrário da nicotina, sejam destituídos de efeito psicoestimulante, que leva à dependência. Tais compostos teriam um mercado importante especialmente entre idosos, que estão se tornando uma grande parcela da população mundial graças às melhorias nas condições de saúde (Graeff e Hetem, 1997 ; Jones e col., 1999; Schilström e col., 1998 ; Salminen e col., 1999)

Outros estudos estão ajudando a desenvolver novas drogas capazes de mimetizar os benefícios específicos oferecidos por esta substância. Algumas drogas sintéticas novas estão sendo testadas para reduzir os efeitos negativos da nicotina, pois já em 1932 Davis e colaboradores mostraram o efeito analgésico da nicotina, mas seu uso era limitado devido aos efeitos colaterais (Jones e col., 1999). O objetivo então é, nos novos compostos, aumentar efeitos positivos da nicotina, usando drogas que atuem apenas em subtipos específicos de receptores

nicotínicos no cérebro. A esse respeito, um alcalóide testado recentemente, a epibatidina, isolado da pele de uma espécie de sapo venenoso, *Epipedobates tricolor*, mostrou-se cerca de duzentas vezes mais potente em promover analgesia do que a morfina e parece atuar em RCNn (Traynor, 1998). Pela análise estrutural desse alcalóide, se desenvolveu o ABT-594, um potente analgésico com menores efeitos colaterais que os usuais (Traynor, 1998). Duas outras drogas sintéticas que parecem agir especificamente em diferentes subtipos de receptores nicotínicos estão sendo testadas em pacientes com doença de Parkinson e de Alzheimer. A expectativa é de que essas drogas possam ajudar a reverter os prejuízos na função motora e na atenção, bem como na memória. Estudos clínicos mostram que a disponibilização de nicotina através de adesivos colocados na pele, aumenta a atenção em pacientes parkinsonianos e, em baixas doses, melhora a memória em pacientes com Alzheimer (Nicotine and the brain, 1998).

Frente a estas considerações sobre a atividade colinérgica nicotínica, a estratégia experimental foi verificar o possível envolvimento dos RCN neuronais no efeito do tipo ansiolítico do EA de *C. catrhausenensis*, o que levou ao pré-tratamento com a mecamilamina (MA), um antagonista não competitivo de ação em RCN neuronais (Vizi e Lendvai, 1999), composto capaz de bloquear a maioria dos RCN que contém as sub-unidades $\alpha 2 - 5$ e $\beta 2 - 4$ (Jones e col, 1999). Essa droga é bastante utilizada em estudos da literatura relacionados à nicotina, e foi aqui usada na tentativa de antagonizar o efeito do tipo ansiolítico apresentado pela mesma no LCE (Brioni e col., 1993)

De fato, o pré tratamento com a mecamilamina reverteu significativamente o efeito do tipo ansiolítico do EA como observado no tempo de permanência nos braços abertos do LCE, no número de estiramentos, e de imersões de cabeça. Estes resultados reforçam a idéia de que o EA esteja promovendo seu efeito do tipo ansiolítico envolvendo os receptores colinérgicos nicotínicos neuronais. No entanto, o mesmo experimento mostrou uma redução do número de entradas nos braços fechados do LCE, que neste teste é considerado indicativo de um comprometimento na atividade exploratória ou motora, o que poderia ser decorrente do uso da MA, já que o EA não havia produzido qualquer alteração motora. Desta forma, fez-se necessário a realização de experimentos complementares capazes de avaliar as condições dos animais quanto a esse aspecto quando da utilização da MA, para que se pudesse dissociar um efeito ansiolítico da redução da movimentação dos animais.

Os experimentos realizados para os fins acima propostos foram o teste do campo aberto, para avaliação da atividade exploratória, e o teste do "rota-rod", para a avaliação da performance motora dos animais. Em ambos os testes os resultados obtidos não indicaram prejuízo exploratório ou motor com o tratamento com a MA, sendo que o único parâmetro alterado significativamente foi o número de bolos fecais no teste do campo aberto, que se mostrou reduzido em relação ao grupo controle, o que pode ter ocorrido por uma provável ação da droga ao nível de sistema nervoso periférico (SNP), talvez por um bloqueio ao nível ganglionar do Sistema Nervoso Autônomo que promoveria um déficit de atividade parassimpática, responsável pelo peristaltismo do trato gastrointestinal (TGI).

Dando continuidade dos experimentos, numa tentativa de ampliar o entendimento dos mecanismos básicos da atividade do tipo ansiolítica do EA da *C. carthagenensis*, especialmente o envolvimento dos receptores nicotínicos centrais, utilizamos outro antagonista de receptores nicotínicos neuronais, a metilcaconitina (MLA), um potente antagonista competitivo para RCN neuronais que contêm a sub-unidade α -7 (Vizi e Lendvai, 1999), que vem sendo bastante utilizado no estudo do efeito da nicotina no SNC (Brioni e col., 1996 ; Schilström e col. 1998, Chang e Berg, 1999; Alkondon e col., 1999).

Os resultados obtidos mostram que, no protocolo utilizado, o EA sozinho não foi capaz de produzir um efeito do tipo ansiolítico significativo, como observado até então nos parâmetros espaço-temporais no LCE. No entanto, em outro parâmetro indicativo de efeito do tipo ansiolítico, o número de estiramentos, o EA foi capaz de reduzi-lo significativamente, sendo este efeito revertido pela MLA.

A utilização da MLA nesta fase dos experimentos foi, devido a uma limitação na quantidade disponível deste antagonista, feita através de administração intracerebroventricular (i.c.v.), diferentemente do protocolo utilizado com os demais antagonistas. Este fato, pode ter sido um fator de estresse maior que o das demais situações, onde a anestesia etérea e a manipulação para introdução da cânula podem ter elevado o nível basal de estresse dos animais a ponto de produzir um estado de ansiedade que não pôde ser revertido pela ação ansiolítica do EA da *C. carthagenensis*. Estudos realizados com a nicotina indicam que realmente o nível de estresse do animais pode interferir na atividade do tipo

ansiolítica desta substância e na dose necessária para obtenção deste efeito (File e col., 1998).

A nicotina pode interagir com a ansiedade em vários níveis, incluído respostas endócrinas e na atenção. Sugere-se que o efeito ansiolítico da nicotina reletado por fumantes seja secundário a a um aumento na capacidade de concentração. Um aumento da vigilância tem sido associado com uma ativação colinérgica que se dá em resposta à ação da nicotina (Gray e col., 1994; Wilkie e col., 1996). Entretanto, o efeito ansiolítico da nicotina também pode estar sendo mediado por um aumento da liberação de GABA (Lena e Changeux, 1997). Uma interação com o complexo receptor GABA-BDZ é reforçado pelo fato do antagonista de BDZ, flumazenil, ser capaz de reverter o efeito ansiolítico da nicotina (O'Neill e Brioni, 1994). Nossos estudos com o flumazenil não permitiram descartar a possibilidade do envolvimento do sistema GABAérgico no efeito do tipo ansiolítico do EA de *C. carthagenensis* (Lorenzo e col., 1999).

A inter-relação entre os sistemas GABAérgico e colinérgico no efeito ansiolítico da nicotina são contrapostos com o efeito ansiogênico que a mesma substância pode promover em resposta à ativação de outros sistemas, como o noradrenérgico (Brazell e col., 1991), ou glutamatérgico (Gray e col., 1996). Além disso, a nicotina também se mostrou capaz de aumentar a liberação do hormônio adenocorticotrófico ACTH (Matta e col., 1990), que teve um efeito ansiogênico no teste de interação social (File e Vellucci, 1978). A administração do agonista de receptores 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT) apresentou efeito ansiogênico no teste de interação social (File e col., 1996). A nicotina, entretanto mostrou-se capaz de

reduzir a liberação de serotonina (5-HT) no hipocampo (Ridley e Balfour, 1997), e também de aumentar a liberação de 5-HT no estriado sem alterações no hipocampo (Reuben e Clarke, 2000), além de aumentar essa liberação no córtex frontal (Ribeiro e col., 1993).

Com o intuito de complementar a caracterização do efeito do tipo ansiolítico da *C. carthagenensis*, foi utilizado uma fração obtida através do processo de solubilização fracionada a frio, obtida à partir do EA, denominada PPT-3, que em testes realizados em estudos de placa motora mostrou-se dez vezes mais ativa que o EA na reversão do bloqueio neuromuscular em preparações nervo frênico-músculo diafragma de camundongo exercido pela d-tubocurarina (Viel, 1998). O PPT-3 em tratamento oral agudo, embora tenha promovido efeito do tipo ansiolítico em uma das doses utilizadas (0,25 g/kg), não deixa claro, de acordo com os resultados obtidos, se este composto foi mais ativo que o EA na produção deste efeito, pois a concentração do princípio biologicamente ativo para o efeito do tipo ansiolítico pode ter ocorrido, porém tal efeito poderia estar sendo perdido devido a concentração de outros componentes do extratos que interfiram com o primeiro, ou ainda, que a concentração esteja realmente se dando, e que na dose mais alta atue também em outros sistemas neuronais que promovam um efeito ansiogênico se contrapondo com aqueles promotores do efeito ansiolítico, como visto anteriormente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- O extrato aquoso (EA) de *Cuphea carthagenensis* em tratamento agudo sonda gástrica (1h, v.o.) nas doses de 0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg produziu um efeito do tipo ansiolítico detectável nos parâmetros clássicos do labirinto em cruz elevado.
- O extrato aquoso (EA) de *Cuphea carthagenensis* em tratamento por sonda gástrica repetido (14 dias, v.o., *bid*) nas doses de 0,25 ; 0,5 e 1,0 g/kg produziu um efeito do tipo ansiolítico avaliado nos parâmetros do labirinto em cruz elevado, ainda mais evidente que no tratamento agudo, não mostrando, portanto, o desenvolvimento de tolerância a este efeito.
- Testes complementares, como o sono induzido por barbitúrico, convulsões induzidas quimicamente por pentilenotetrazol ou por eletrochoque máximo transcorneal, sugerem que o efeito ansiolítico observado com o EA de *C. carthagenensis* envolva mecanismos distintos ao dos benzodiazepínicos, embora não seja possível descartar uma modulação do sistema GABAérgico no efeito observado.
- Antagonistas de receptores nicotínicos neuronais utilizados, foram eficazes em reverter o efeito do tipo ansiolítico do EA avaliado no LCE.
- Não foi possível avaliar, no presente estudo, como se dá ao nível molecular essa interação com os receptores nicotínicos e, tampouco, que outros sistemas neuronais podem estar envolvidos na produção deste efeito ansiolítico.
- A fração semi-purificada PPT-3 do EA de *Cuphea carthagenensis*, em tratamento agudo por sonda gástrica (1h, v.o.) nas doses de 0,1 ; 0,25 e 0,5

g/kg, produziu um efeito do tipo ansiolítico detectável apenas para a dose de 0,25 g/kg, e não modificou quaisquer parâmetros dos teste complementares aos quais foi submetido. Não fica claro, no entanto, com os resultados do LCE se o processo de fracionamento foi capaz de concentrar os princípios biologicamente ativos responsáveis pelo efeito do tipo ansiolítico da *Cuphea carthagenensis*.

- Os dados obtidos no presente trabalho sugerem ainda que os receptores nicotínicos neuronais parecem exercer um importante papel modulatório na ansiedade experimental, não descartando o envolvimento ou a interação do sistema colinérgico com outros sistemas neuronais tais como o GABAérgico, noradrenérgico, glutamatérgico e serotoninérgico.
- Nossos resultados permitem concluir que o EA e a fração semi-purificada de *Cuphea carthagenensis* possuem uma atividade do tipo ansiolítica, que parece ser mediada por receptores colinérgicos nicotínicos neuronais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKONDON, M.; PEREIRA, E.F.R.; EISENBERG, H.M.; ALBUQUERQUE, E.X.
Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. **J. Neurosci.** **1**, **19(7)**: 2693-2705, 1999.
- ANDREATINI, R. e LEITE, J.R. Effect of valepotriates on the behavior of rats in the elevated plus-maze during diazepam withdrawal. **Eur. J. Pharmacol**, **260** (2-3): 233-235, 1994.
- ARCHER, J. – Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, **21**: 205-235, 1973
- BRAWMAN-MINTZER, O. e LYDIARD, R.B. – Biological basis of generalized anxiety disorder, **J. Clin. Psych.**, **51**: 16-25, 1997.
- BRAZELL, M.P.; MITCHEL, S.N. e GRAY, J.A. – Effect of acute administration of nicotine on *in vivo* release of noradrenaline in hippocampus of freely moving rats: a dose-response and antagonist study. **Neuropharmacology**, **30**: 823-833.
- BRIONI, J.D.; KIM, D.J.B.; O'NEILL, A.B. Nicotine cue: lack of effect of the $\alpha 7$ nicotinic receptor antagonist methyllycaconitine. **European J. Pharmacol.**, **301**:1-5,1996.
- BRIONI, J.D.; O'NEILL, A.B.; KIM, D.J.B.; DECKER, M.W. - Nicotinic receptors agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. **European J. Pharmacol.**, **238**: 1-8,1993.

- CARLINI, E. A.; CONTAR, J. DE D. P.; SILVA-FILHO, A. R.; SILVEIRA-FILHO, N. G. DA; FROCHTENGARTEN, M. L.; BUENO, O. F.A. Pharmacology of Lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.**, **17**: 37-64, 1986.
- CASTEL, S. e SCALCO, M.Z. – Transtornos fóbicos. In: Hethem, L.A.B. & Graeff, F.G.(eds.) - **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade** – Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro – RJ, pp. 295 - 322, 1997.
- CHANG, K.T.; BERG, D.K. – Nicotinic acetylcholine receptors containing $\alpha 7$ subunits are required for reliable synaptic transmission *in situ*. **J. Neuroscience**, **15**, **19(10)**: 3701-3710, 1999.
- COIMBRA, R. - **Notas de fitoterapia**. Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia. 2ª edição – pág. 95, 1958.
- CORRÊA, M.P. – **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultiváveis**, Vol. 1, pág. 483, Rio de Janeiro, 1975.
- CRUZ, A.P.M.; FREI, F. e GRAEFF, F.G. – Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, **49**: 171-176, 1994.
- CUPHEA, www.geocities.com/SoHo/Square/9356/plantas3.htm.
- DALVI, A. e RODGERS, R.J. – GABAergic influences on plus-maze behavior in mice. **Psychopharmacology**, **128**: 380-397, 1996.
- DE LIMA, T.C.M., GAVIOLI, E.; CRUZES, M.N.; BARETTA, I. e LAPA, A.J. – Caracterização dos efeitos comportamentais do tratamento repetido com o extrato bruto aquoso de *Cuphea carthagenensis* L. (sete-sangrias) em

- camundongos. **Resumos da XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 26-29 de agosto, Caxambu – MG, 1998.
- DE LIMA, T.C.M.; LORENZO, M.A.; GAVIOLI, E.C.; BARETTA, I.P.; TORRES, L.M.B. e LAPA, A.J. – Efeitos do extrato aquoso (EA) e de uma fração semi-purificada de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) F. MacBr. no comportamento de camundongos no labirinto em cruz elevado. **Resumos do I Congresso de Plantas Aromáticas e Medicinais dos Países de Língua Oficial Portuguesa**, 7 a 9 de julho, 1999 – Ansião – Portugal.
- DE LORY, T.M. e OLSEN, R.W. – GABA and glycine. In: Siegel, G.J.; Agranoff, B.W.; Albers, R.W.; Molinoff, P.B. (eds.) **Basic Neurochemistry**, 1st ed., Raven Press, New York, pp. 389-399, 1994.
- DUNHAM, N.W. e MIYA, T.S. – A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Ass.**, **156**: 208-210, 1957.
- ERICEIRA, V.R.; MARTINS, M.M.R.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. – Atividade farmacológica do extrato etanólico da “sete-sangrias”, a *Cuphea balsamonal* Scham e Schltd. **Resumos do VIII Simp. De Plantas Medicinais do Brasil**, p. 35, res. 39, Manaus – AM, 1984.
- FIL, S.E.; GONZÁLES, L.E. e ANDREWS, N. – Comparative study of pre and post-synaptic 5 HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **J. Neurosci.**, **16**: 4810-4815, 1996.
- FILE, S.E. e VELLUCCI, S.V. – Studies on the role of ACTH and 5-HT in anxiety using an animal model. **J. Pharm. Pharmacol.**, **30**: 105-110, 1978.

- FILE; E.S.;KENNY, P.J.;OUAGAZZAL, A-M Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. **Behav. Neurosci.**, **112 (6)**: 1423-1429, 1998.
- FUGIOKA, T.; KASHIWADA, Y.; KILKUSKIE, R.E.; CONSENTINO, L.M.; JIANG, J.B.; JANZEN, W.P.; CHEN, I.S.; LEE, K.H. – Anti-AIDS agents 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Sizygium claviflorum*, and the anti-HIV activity structurally related triterpenoids. **J. Nat. Prod.** **57(2)**: 243-247, 1994.
- GAVIOLI, E.; CRUZES, M.N.; BARETTA, I.; LAPA, A.J. e DE LIMA, T.C.M., – Influência do tratamento agudo com o extrato bruto aquoso de *Cuphea carthagenensis* L. (sete-sangrias) no comportamento de camundongos. **Resumos da XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 26-29 de agosto, Caxambu – MG, 1998.
- GONZÁLES, A.G.; VALENCIA, E.; SIVERIO EXPÓSITO, T.; BERMEJO BARRERA, J.; GUPTA, M.P. – Chemical components of *Cuphea* species. Carthagenol: a new triterpene from *C. carthagenensis*. **Planta Medica** **60**: 592-593, 1994.
- GOTTLIEB, O. E KAPLAN, M.A. – Das plantas medicinais ao fármacos naturais. **Ciência Hoje**, **15 (89)**: 51-54, 1993.
- GRAEFF, F.G. – Ansiedade. In: Graeff, F.G. & Brandão, M.L. (eds.) – **Neurobiologia das Doenças Mentais**, Lemos Editorial , São Paulo, pp. 109-144, 1993.

- GRAEFF, F.G. – Ansiedade. In: Graeff, F.G. & Brandão, M.L. (eds.) – **Neurobiologia das Doenças Mentais**, Lemos Editorial, São Paulo, pp. 109-144, 1996.
- GRAEFF, F.G. – Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Braz. J. Med. Biol.Res** **27**: 811-829, 1994.
- GRAEFF, F.G. e HETEM, L.A.B. – Neurotransmissores e ansiedade. In: Hethem, L.A.B. & Graeff, F.G.(eds.) - **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade** – Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro – RJ, pp. 355 - 385, 1997.
- GRAHAM, S.A. – The flowering plant family Lytraceae, the loose strifes: the genera of North America including Mexico and Central America – www.kent.edu/biology/graham1/genera.htm, 1998.
- GRAY, J.A.; MITCHEL, S.N.; JOSEPH, M.H.; GRIGORIAN, G.; DAWE, S. e HODGES, H. – Neurochemical mechanisms mediating the behavioral and cognitive effects of nicotine. **Drug Development Res.**, **31**: 3-17, 1994
- GRAY, R.; RAJAN, A.S.; RADCLIFFE, K.A.YAKEHIRO, M. e DANI, J.A. – Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentrations of nicotine. **Nature.**, **383**: 713-716, 1996.
- GREEN, W.N. e WANAMAKER, C.P. – Formation of the nicotinic acetilcholine receptor binding sites. **J. Neurosci.**, **18**(15): 5555-5554, 1998.
- HALEY, T.J. e McCORMIC, W.G. – Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. **British J. Pharmacol.**, **12**: 12–15, 1957.

- HANDLEY, S. e MITHANI, S. – Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behavior. **Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.**, **327**: 1-5, 1984.
- HARBONE, I.C. e BAXTER, H. (eds.) – Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants. Taylor & Frost, Londres, 791pp., 1983.
- JONES, S.; SUDWEEKS, S. e YAKEL, J.L. – Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. **TINS**. **22**: 555-561, 1999.
- JORDAN, A.D.; KORDIK, C.P.; REITZ, A.B. e SANFILIPPO, P.J., - Novel anxiolytics agents – 1994 to present, **Exp. Opin. Ther. Patents**, **6**(10): 1047-1060, 1996.
- KLEIMAN, R. – Chemistry of new industrial oilseed crops. In: **Advanced in new crops**. Janick, J. and Simon, J.E. Timber Press, Portland, OR., 1990.
- KURIBARA, H.; STAVINOHA, W.B. e MARUYAMA, Y. – Honokiol, a putative anxiolytic agent extracted from Magnolia Bark, has no diazepam-like side – effects in mice. **J. Pharm. Pharmacol.** **51**: 97-103, 1998.
- LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T. - Validation of medicinal plants in Latin America: reasons and goals. **Tópicos en Productos Naturales: la biodiversidad como fuente de moléculas activas**, Echeverri, F. & Quiñones F., W. (eds.) , Medellín, Colômbia, 1997.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R. O. & DE LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia dos produtos naturais: da droga ao medicamento, In: SIMÕES, C. M. O. *et al.*, **Farmacognosia**, Ed. UFSC – Ed. UFRGS, Florianópolis - Porto Alegre, 1999, pp. 181-196.

- LAURSEN, S.E. e BELKNAP, J.K. – Intracerebroventricular injections in mice:some methodological refinements. **J. Pharmacol. Met.**, **16**: 155-157, 1986.
- LEE,C; RODGERS, R.J.-Effects of bezodiazepine receptor antagonist, flumazenil, on antinociceptive and behavioral responses to the elevated plus-maze in mice. **Neuropharmacology**, **30 (12A)**:1263-1267.1991.
- LENA, C. e CHANGEUX, J.P. – Role of CA⁺² ions in nicotinic facilitation of GABA release in mouse thalamus. **J. Neuroscience.**, **17**: 576-585, 1997.
- LISTER, R.G. – The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, **92**: 180-185, 1987.
- LOPES, M.S. – Classificação dos estados de ansiedade. In: Hethem, L.A.B. & Graeff, F.G.(eds.) - **Ansiedade e Transtornos de Ansiedade** – Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro - RJ, pp. 51 – 82, 1997.
- LORENZI, N. – **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2^ª edição, 1991.
- LORENZO, M. A. ; LAPA, A. J. & DE LIMA, T. C. M. Efeito do tipo ansiolítico do extrato aquoso (EA) de *Cuphea carthagenensis*. **XIV Reunião da FESBE**, Caxambu - MG, 1999.
- MATTA, S.G.; McALLEN, K.M. e SHARP, B.M. – Role of the fourth cerebroventricle in mediating rat plasma ACTH responses to intravenous nicotine. **J. Pharm. and Experim. Therapeutics.**, **252**: 623-630, 1990.
- MAURAT, A.M.; NARDI, A.E. e VERSIANI, M. – Transtornos relacionados ao estresse. In: Hethem, L.A.B. & Graeff, F.G. (eds.) - **Ansiedade e**

- Transtornos de Ansiedade** – Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro – RJ, pp. 355 - 385, 1997.
- MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, **48**: 254-260, 1955.
- NARDI, A.E.; FIGUEIRA, I. e VERSIANI, M. – Transtornos de Ansiedade Generalizada. In: Hethem, L.A.B. & Graeff, F.G.(eds.) - **Ansiedade e transtornos de ansiedade** – Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro – RJ, pp. 323 - 353, 1997.
- NICOTINE AND THE BRAIN, **Brain briefings**, www.snf.org/briefings/nicotine.html.
- O'NEILL, A.B. e BRIONI, J.D. – Benzodiazepinereceptor mediation of the anxiolytic-like effect of nicotine in mice. **Pharm. Biochem. Behav.**, **49**: 755-757, 1994.
- OKA, P. e ROPERTO, A. – **Herbário Cris Oka**, www.coyianet.com.br/eco//herb/setes.htm, 1998.
- OLSEN, R.W. – The GABA postsynaptic membrane receptor-ionophore complex. Site of action of convulsant and anticonvulsant drugs. **Mol. Cell. Biochem.**, **39**: 261–279, 1981.
- OUAGAZZAL, A.; KENNY, P.J. FILE, S.E. Modulation of behaviour on trials 1 and 2 in the elevated plus-maze test of anxiety after systemic and hippocampal administration of nicotine. **Psychopharmacology**, **144**: 54-60, 1998.
- PELLOW, S. e FILE, S.E. – Multiple sites of action for ansiogenic drugs: Behavioural, eletrophysiological and biochemica correlactions. **Psychopharmacology (Berlin)**, **83**: 304-315, 1984.

- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. e BRILEY, M – Validation of open-closed arm entries in na elevated pluz-maze as a measure of anxiety in tha rat. **J. Neurosci. Meth.**, **14**: 149-167, 1985.
- RAMOS, R.T. e BERNIK, M.A. – Transtorno de pânico. In: Hethem, L.A.B. & Graeff, F.G.(eds.) - **Ansiedade e transtornos de ansiedade** – Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro – RJ, pp. 271 - 293,1997.
- RECIO, M.C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; GUEHO, J.; JULIEN, H.R.; HOSTETTMANN, K.; RIOS, J.L. – Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. **Planta Medica**, **61(1)**: 9-12, 1994.
- REUBEN,M.; CLARKE,P.B.S. – Nicotine-evoked [³H] 5-hidroxytryptamine release from rat striatal synaptosomes. **Neuropharmacology**, **39 (2)**: 290-299, 2000.
- RIBEIRO, E.B.; BETTIKER, R.L.; BOGDANOV, M. e WURTMAN, R.J. – Effects of systemic nicotine on serotoninine release in rat brain. **Brain Res.**, **621**: 311-318, 1993
- RICKELS, K. e SCHWEIZER, E. – The clinical presentation of generalized anxiety in primary-care settings: practical concepts of classification and management, **J. Clin. Psych.**, **58**: 4-9, 1997.
- RIDLEY, D.L. e BALFOUR, D.J.K. – The influence of nicotine on 5-HT outflow in the dorsal hippocampus of the rat. **British J. Phamacol.**, **122**: 192-470.
- RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A. e HOLMES, A. – Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **30**: 289-304, 1997.

- SALMINEN, O.; SEPPA, T.; GÄDDNÄS, H.; AHTEE, L. – The effect of acute nicotine on the metabolism of dopamine and the expression of Fos protein in striatal and limbic areas of rats during chronic nicotine infusion and its withdrawal. **J. Neurosci.**, **19(10)**: 8145-8151, 1999.
- SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A. – Flavonoids of species of *Cuphea* (Lythraceae) from Brazil. **Biochem. Syst. Ecol.** **23(1)**: 99-103, 1995.
- SANTOS, S.N. – **Atividades farmacológicas da *Cuphea aperta* Koehne (sete-sangrias)**. Tese de mestrado apresentada à Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1987.
- SCHLSTRÖM, B.; SVENSSOM, H.M.; SVENSSOM, T.H.; NOMIKOS, G.G. Nicotine and food induced dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: putative role of the $\alpha 7$ nicotinic receptor in the ventral tegmental area. **Neuroscience**, **85 (4)**: 1005-1009, 1998.
- SCHULDT, E.Z. – **Avaliação farmacológica do extrato bruto hidroalcoólico, frações, subfrações e compostos isolados de *Cuphea carthagenensis* Jacq. McBride (sete-sangrias) – Determinação da capacidade antioxidante**. Tese de mestrado apresentada a Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 1999.
- SETE-SANGRIAS, www.canalvip.com.br/neumart/pm/cuphcalo.htm
- SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, **21**: 227-236, 1946.

- STEINLEIN, O.K.; DECKERT, J.; NÖTTEN; FRANKE, P.; MAIER, W;
BECKMANN; PROPPING, P. – Neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 4$
subunit (CHRNA4) and panic disorder: an association study. **Am. J. Med.
Genetics, 74:** 199-201,1997.
- SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C. e GOODMAN, L.S. – Comparative assays of
antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther., 106:** 319-
330, 1952.
- TORRES, A.R. – Ansiedade e transtorno obsessivo-compulsivo. In: Hethem,
L.A.B. & Graeff, F.G.(eds.) - **Ansiedade e transtornos de ansiedade** –
Editora Científica Nacional, Rio de Janeiro – RJ, pp. 401 - 432,1997.
- TRAYNOR, J.R. - Epibatidine and pain - **Br. J. Anaesth., 81:** 69 - 76, 1998.
- TREIT, D.; PESOLD, C. e ROTZINGER, S. – Dissociating the anti-fear effects of
septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated
models of rat anxiety. **Behav. Neurosci., 107:** 770-785, 1993.
- VIEL, T.A. – **Ações do extrato aquoso e frações purificadas de *Cuphea
carthagenensis* (Jacq) J.F. Macbr. (sete-sangrias) em sinapses
colinérgicas periféricas.** Tese de mestrado apresentada à UNIFESP-
Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1998.
- VIZI, E.S.; LENDVAI, B. Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in
synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous
system. **Brain Res. Rev., 30,**219-235 ,1999.
- w3TROPICOS – Missouri Botanical Garden – Nomenclatural Data Base.
<http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search/pick>, 1997.

WILKIE, G.I.; HUTSON, P.; SULLIVAN, J.P. e WONNACOTT, S. –
Pharmacological characterization of a nicotinic autoreceptor in rat
hipocampal synaptossomes. **Neurochem. Res.**, **21**: 1141-1148, 1996.